

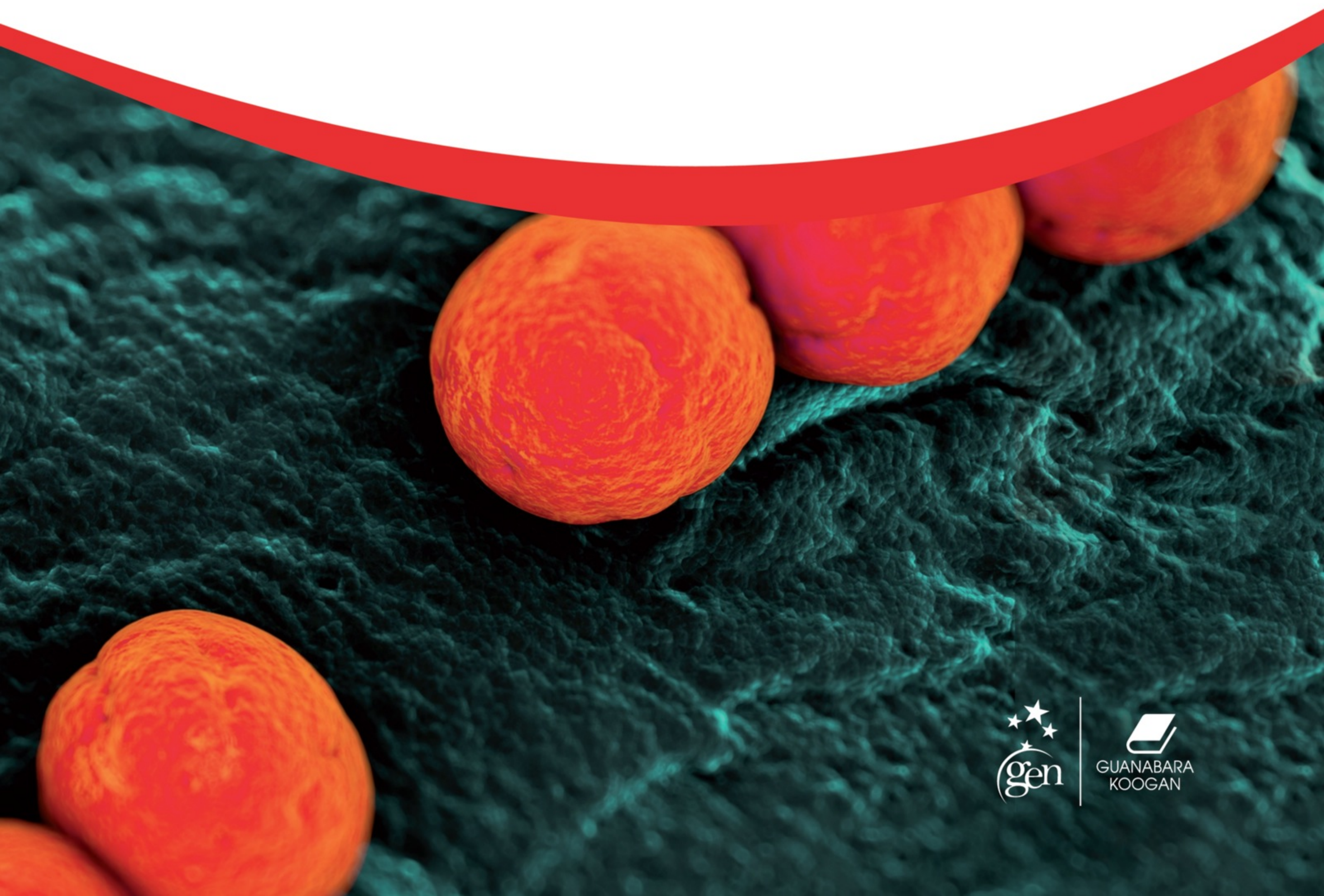
Antonio Walter Ferreira

Sandra do Lago Moraes

# Diagnóstico Laboratorial

das Principais Doenças  
Infecciosas e Autoimunes

Terceira edição









# Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes

---

## Correlações Clínico-Laboratoriais





---

O GEN | Grupo Editorial Nacional reúne as editoras Guanabara Koogan, Santos, Roca, AC Farmacêutica, Forense, Método, LTC, E.P.U. e Forense Universitária, que publicam nas áreas científica, técnica e profissional.

Essas empresas, respeitadas no mercado editorial, construíram catálogos inigualáveis, com obras que têm sido decisivas na formação acadêmica e no aperfeiçoamento de várias gerações de profissionais e de estudantes de Administração, Direito, Enfermagem, Engenharia, Fisioterapia, Medicina, Odontologia, Educação Física e muitas outras ciências, tendo se tornado sinônimo de seriedade e respeito.

Nossa missão é prover o melhor conteúdo científico e distribuí-lo de maneira flexível e conveniente, a preços justos, gerando benefícios e servindo a autores, docentes, livreiros, funcionários, colaboradores e acionistas.

Nosso comportamento ético incondicional e nossa responsabilidade social e ambiental são reforçados pela natureza educacional de nossa atividade, sem comprometer o crescimento contínuo e a rentabilidade do grupo.

---



# Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes

---

## Correlações Clínico-Laboratoriais

**Antonio Walter Ferreira, PhD**

Professor Assistente Doutor do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP e Instituto de Medicina  
Tropical da USP.

**Sandra do Lago Moraes, PhD**

Pesquisadora Científica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de  
São Paulo – USP.

Terceira edição



■ Os autores deste livro e a EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. empenharam seus melhores esforços para assegurar que as informações e os procedimentos apresentados no texto estejam em acordo com os padrões aceitos à época da publicação, *e todos os dados foram atualizados pelos autores até a data da entrega dos originais à editora*. Entretanto, tendo em conta a evolução das ciências da saúde, as mudanças regulamentares governamentais e o constante fluxo de novas informações sobre terapêutica medicamentosa e reações adversas a fármacos, recomendamos enfaticamente que os leitores consultem sempre outras fontes fidedignas, de modo a se certificarem de que as informações contidas neste livro estão corretas e de que não houve alterações nas dosagens recomendadas ou na legislação regulamentadora. *Adicionalmente, os leitores podem buscar por possíveis atualizações da obra em <http://gen-io.grupogen.com.br>.*

■ Os autores e a editora se empenharam para citar adequadamente e dar o devido crédito a todos os detentores de direitos autorais de qualquer material utilizado neste livro, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertida e involuntariamente, a identificação de algum deles tenha sido omitida.

■ Direitos exclusivos para a língua portuguesa

Copyright © 2013 by

**EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.**

**Uma editora integrante do GEN | Grupo Editorial Nacional**

Travessa do Ouvidor, 11


Rio de Janeiro – RJ – CEP 20040-040

Tels.: (21) 3543-0770/(11) 5080-0770 | Fax: (21) 3543-0896

[www.editoraguanabara.com.br](http://www.editoraguanabara.com.br) | [www.grupogen.com.br](http://www.grupogen.com.br) | [editorial.saude@grupogen.com.br](mailto:editorial.saude@grupogen.com.br)

■ Reservados todos os direitos. É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, em quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição pela Internet ou outros), sem permissão, por escrito, da EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.

■ Capa: Editora Guanabara Koogan

Editoração eletrônica:  Anthares

Projeto gráfico: Editora Guanabara Koogan

■ Ficha catalográfica

F439d

3. ed.

Ferreira, Antonio Walter

Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes :

correlações clínico-laboratoriais / Antonio Walter Ferreira e Sandra do Lago Moraes.

- 3. ed. - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2013.

il.

ISBN 978-85-277-2302-2

1. Doenças transmissíveis - Diagnóstico. 2. Doenças parasitárias - Diagnóstico.

3. Doenças autoimunes - Diagnóstico I. Moraes, Sandra do Lago. II. Título.

13-01624.

CDD: 616.90475

CDU: 616.9



# Colaboradores

## **Adelaide José Vaz, MSc, PhD (*in memoriam*)**

Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP.

## **Alda Maria da Cruz, MD, PhD**

Professora Associada da disciplina Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Pesquisadora Titular em Saúde Pública do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

## **Alexandre Meneghello Fuentefria, Sc, PhD**

Professor Adjunto Doutor do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRG.

## **Aluísio Augusto Cotrim Segurado, MD, PhD**

Professor Titular do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

## **Ana Karolina Barreto de Oliveira, MD, MSc**

Médica colaboradora do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas – FMUSP.

## **Ana Marisa Fusco Almeida, MSc, PhD**

Professora Assistente Doutora da disciplina Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp (Araraquara). Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

## **Angela Maria Egydio de C. Barreto, MSc**

Chefe do Departamento de Diagnóstico da Sorologia da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo.

## **Benedito Anselmo Peres, PhD**

Professor Assistente Doutor do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

## **Cláudio Sérgio Pannuti, MD, PhD**

Professor Associado do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Docente pesquisador do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo.

## **Cristina Maria Kokron, MD, PhD**

Professora Assistente Doutora e Colaboradora Médica da disciplina Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Vice-Coordenadora do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60) – FMUSP.

## **Cristina Miuki Abe Jacob, MD, PhD**

Professora Associada do Departamento de Pediatria e Chefe da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

## **Cristóvão Luis Pitangueira Manguiera, MD, PhD, MBA**

Gerente Médico do Departamento de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein. Médico da seção de Imunologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

## **Edite Hatsumi Y. Kanashiro, MSc**

Pesquisadora do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

## **Edna Maria Vissoci Reiche, MSc**

Professora Associada do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina. Responsável pelos setores de Imunologia Clínica e Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

## **Edward Oliveira, MSc, PhD**

Pesquisador Nível II do CNPq e Pesquisador Adjunto no Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz.

## **Eide Dias Camargo**

Pesquisadora Científica, Divisão de Biologia Médica, Seção de Sorologia, Área de Imunodiagnóstico do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde.

## **Emanuela Avelar Silva Costa, MSc**

Doutoranda em Ciências do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

## **Ester Cerdeira Sabino, MD, PhD**

Professor Livre-Docente do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.



**Gerusa Dreyer, MD, PhD**

Professora Adjunta aposentada de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e Pesquisadora Titular aposentada do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz. Consultora Científica da ONG Amaury Coutinho para Doenças Tropicais.

**Guita Elefant, MSc, PhD**

Pesquisadora Científica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

**Ivani Lúcia Leme, MSc, PhD**

Pesquisadora Científica da disciplina Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e membro da Comissão de Epidemiologia Hospitalar – Controle Ambiental do Hospital São Paulo.

**Jerolino Lopes Aquino**

Professor Titular aposentado de Parasitologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT. Chefe do setor de Parasitologia do Laboratório Carlos Chagas em Cuiabá (MT).

**João Renato Rebello Pinho, MD, PhD**

Médico do Departamento de Patologia Clínica do Hospital Israelita Albert Einstein e do Departamento de Gastrenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

**José Antônio Livramento, MD, PhD**

Professor Livre-Docente do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Sócio do Laboratório de Neurodiagnóstico Spina França.

**José Eduardo Levi, MSc, PhD**

Pesquisador do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP. Chefe do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Consultor de Pesquisas do Banco de Sangue do Hospital Albert Einstein (SP).

**José Figuerêdo-Silva, PhD**

Ex-Professor Titular do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Professor adjunto de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Piauí – UESPI.

**José Marcos Pereira Costa, MD, MSc**

Médico Infectologista e Patologista Clínico do Hospital Heliópolis do Estado de São Paulo.

**José Pascoal Simonetti, MSc**

Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Consultor Técnico e Científico em Biologia Molecular, Virologia, Imunovirologia, Biossegurança e Bioproteção. Assessor Técnico e Científico para a Superintendência de Vigilância em Saúde/CGLab/MS e para a Coordenação Geral de Assuntos Regulatórios, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos/MS.

**Kelly Aparecida Kanunfre, MSc, PhD**

Pesquisadora Científica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

**Kioko Takei, MSc, PhD**

Professora Doutora aposentada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP e responsável pela Unidade de Imunologia do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo.

**Lilian Ferri Passadore, MSc**

Farmacêutica do setor de Biologia Molecular do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – USP.

**Luciana de Almeida Silva Teixeira, MD, MSc, PhD**

Professora Adjunta da disciplina Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM.

**Luís dos Ramos Machado, MD, PhD**

Professor Assistente Doutor em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Membro e ex-chefe do Grupo de Doenças Infecciosas do Sistema Nervoso do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Editor da revista *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*.

**Maíra Pedreschi, MSc**

Doutoranda em Ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Colaboradora do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM - 60) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Márcia de Souza Carvalho Melhem, MSc, PhD**

Pesquisadora Científica nível VI do Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde.

**Marcos Vinícius da Silva, MD, MSc, PhD**

Professor Associado do Departamento de Medicina da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade de Campinas (SP), disciplina Doenças Infecciosas e Parasitárias. Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Diretor da Divisão Científica do Instituto de Infectologia Emílio Ribas da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

**Maria Carmen Arroyo Sanchez, MSc, PhD**

Pesquisadora Científica do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

**Maria José S. Mendes-Gianinni, MSc, PhD**

Professora Titular do Departamento de Análises Clínicas, disciplina Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Pró-Reitora de Pesquisa da UNESP e membro do Conselho Superior da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP.



**Mário Endsfieldz Camargo, MD, PhD**

Professor Assistente Doutor do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

**Olavo Henrique Munhoz Leite, MD**

Infectologista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – SP. URDIP – CEPES, Faculdade de Medicina do ABC.

**Paulo Jaconi Saraiva, MSc, PhD**

Professor Adjunto IV da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Diretor Técnico do Laboratório IMUNO Pesquisas Clínicas.

**Pedro Paulo Chieffi, MD, PhD**

Professor Titular da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Professor Assistente Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo) – USP.

**Regina Ayr Florio da Cunha, MSc, PhD**

Professora Assistente Doutora aposentada do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP.

**Regina Célia Rodrigues de Moraes Abdulkader, MSc, PhD**

Professora Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

**Sandra Regina Rodrigues Simonetti, MSc, PhD**

Tecnologista em Saúde Pública do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

**Sandra Trevisan Beck, MSc, PhD**

Professora Associada de Imunologia Clínica do curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM (RS).

**Silvia Maria Di Santi, MSc, PhD**

Pesquisadora Científica VI na Superintendência de Controle de Endemias. Professora Orientadora no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

**Sumie Hoshino-Shimizu, PhD**

Pesquisadora Associada do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP. Professora Titular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Orientadora *ad hoc* nos cursos de Pós-Graduação da USP e da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

**Thelma Suely Okay, MD, PhD**

Professora Livre-Docente pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Internacional da USP. Chefe do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

**Yoshimi Imoto Yamamoto, MSc, PhD**

Professora Assistente Doutora aposentada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP. Professora do curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie.







# Homenagens



Prestamos uma singela homenagem à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adelaide José Vaz, amiga e colaboradora, que faleceu em 27 de setembro de 2011, deixando-nos um enorme vazio.

Farmacêutica bioquímica, formada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, iniciou suas atividades profissionais como pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, na seção de Sorologia, realizando e desenvolvendo testes para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Para entender melhor as questões jurídicas, ainda ingressou na Faculdade de Direito do Largo de São Francisco, na qual concluiu o curso em 1995.

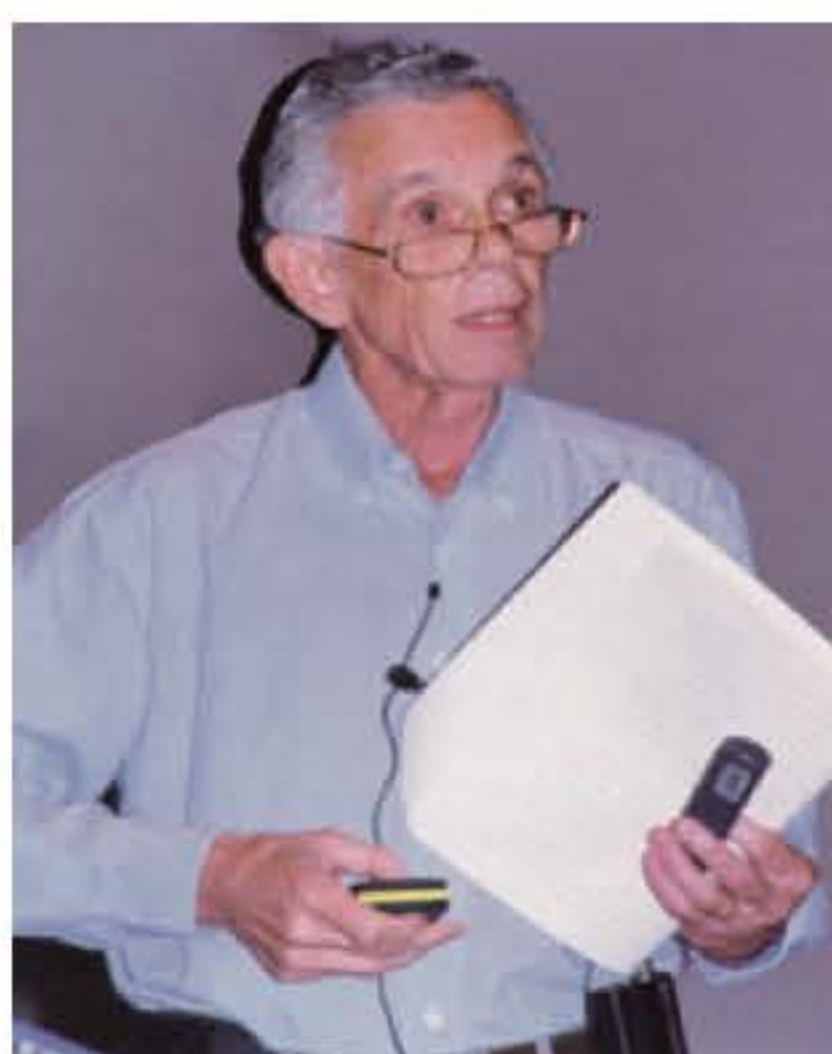
A partir de 1994, ingressou como docente em turno completo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, na qual teve a oportunidade de ensinar e difundir conhecimentos, orientando e formando mestres e doutores, além de publicar inúmeros trabalhos científicos – principalmente sobre neurocisticercose – com repercussão nacional e internacional.

Destacou-se como professora de cursos de graduação e pós-graduação de várias outras instituições de ensino – Universidade de Guarulhos, Universidade Paulista, Universidade São Judas Tadeu e Faculdades Oswaldo Cruz – e recebeu inúmeras homenagens por sua conduta ética e profissional.

Participou do Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, como Conselheira e Presidente, no período de 1990 a 1993, atuando com firmeza na defesa do interesse do profissional farmacêutico.

Tive o prazer de orientá-la em sua dissertação de mestrado e em sua tese de doutorado, concluída em 1993, no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Adelaide foi uma aluna exemplar. Autodidata, comprometida, responsável e criativa, foi muito mais uma parceira do que uma orientanda. Como orientador, também aprendi muito sobre neurocisticercose, sua área de atuação favorita.

Adelaide deixou saudades.



Nascido em 12 de maio de 1922, em São Paulo, Mário Endzfeld Camargo estava predestinado a ser uma figura importante no mundo da pesquisa em análises clínicas, principalmente no diagnóstico sorológico de doenças infecciosas e parasitárias. Formado em Medicina pela tradicional Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 1946, começou o seu trabalho no laboratório de análises clínicas do Hospital Sorocabano. No início da década de 1960 foi convidado pelo Prof. Carlos da Silva Lacaz, diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMTSP, a chefiar o Laboratório de Sorologia. No mesmo período, foi convidado a fazer parte do Laboratório de Análises Clínicas Fleury, hoje Fleury Medicina e Saúde. Com brilhantismo defendeu seu doutorado em 1964, introduzindo uma nova metodologia para o diagnóstico da toxoplasmose. A metodologia idealizada por Camargo, como gosta de ser chamado entre seus amigos e discípulos, abriu perspectivas sem limites para a utilização da reação de imunofluorescência no diagnóstico sorológico. No IMTSP criou o curso

de Imunofluorescência, sendo o responsável pela formação de centenas de profissionais no Brasil e no exterior. Membro da Organização Mundial da Saúde, ministrou conferências e cursos pelo Brasil e em diferentes países da América Latina, além de ter orientado inúmeros profissionais em teses de mestrado e doutorado. Foi dele a ideia de utilizar classes de imunoglobulinas e a propriedade da afinidade funcional dos anticorpos IgG para avaliar fases clínicas das doenças. Publicou dezenas de trabalhos, sempre pioneiros e de grande repercussão nacional e internacional. Coordenou a parte laboratorial do maior inquérito soropidemiológico já realizado no mundo, para que pudessemos conhecer a real situação da doença de Chagas no Brasil. Se como pesquisador é notável, como homem é e sempre será um amigo leal, admirado por todos que o conhecem.

Prof. Dr. Mário E. Camargo, um homem à frente do seu tempo.

*Antonio Walter Ferreira*







# Apresentação

Nos últimos anos, a incorporação de laboratórios de pequeno e de médio porte a grandes redes tem possibilitado a execução de rotinas laboratoriais mais amplas somente com processos automatizados e totalmente informatizados. Além disso, métodos de biologia molecular começaram a ser utilizados na realização de exames, e a nanotecnologia padronizada para os *microarrays* ou sistemas multiplex – que há 10 anos eram apenas uma utopia – ganharam espaço ao apresentar perfis definidos para diferentes situações clínicas. Entretanto, o excesso de informações fornecidas nos laudos dos laboratórios muitas vezes gera dúvidas de interpretação sobre o valor clínico dos resultados, confundindo os profissionais em sua suspeita clínica inicial. Por isso, o conhecimento dos princípios dos testes e o valor da informação decorrente dos resultados devem ser cuidadosamente analisados pelos responsáveis pelo diagnóstico laboratorial, para que sejam capazes de esclarecer dúvidas e transmitir seus conhecimentos àqueles que necessitam.

Com o intuito de colaborar na construção desse conhecimento, apresentamos a terceira edição de *Diagnóstico Laboratorial*. Importantes alterações foram realizadas nesta

edição, a começar pelo desenho gráfico, estendendo-se pelo texto, que foi cuidadosamente revisto e atualizado em função da rápida evolução dos testes utilizados em patologia clínica. Buscamos ainda responder aos questionamentos mais frequentes, bem como elucidar a utilização de produtos registrados no Ministério da Saúde, levando em consideração seus limites.

Agradecemos em especial aos dedicados colaboradores desta obra, sem os quais esta edição não se tornaria realidade. Especialistas em suas áreas de atuação, eles souberam expor objetivamente seus conhecimentos, tornando o texto claro e didático. Todos os convidados entenderam que esta atualização era uma necessidade reivindicada por profissionais e estudantes da área da saúde, que sentiram a lacuna deixada durante os anos que se passaram desde o lançamento da última edição.

Agradecemos também à Editora Guanabara Koogan, selo do GEN, pela confiança.

**Antonio Walter Ferreira e  
Sandra do Lago Moraes**







# Sumário

## Seção 1 | Metodologia Geral, 1

### 1 Sorologia | Importância e Parâmetros, 3

Importância dos testes sorológicos na patologia clínica, 4  
Importância da pesquisa de anticorpos no diagnóstico individual, 4  
Importância da pesquisa de anticorpos em inquéritos soroepidemiológicos, 5  
Importância da pesquisa de antígenos, 6  
Parâmetros para validação de um teste diagnóstico, 6  
Aplicação de testes diagnósticos, 10  
Bibliografia, 11

### 2 Testes Sorológicos, 12

Introdução, 13  
Precipitação, 13  
Aglutinação, 18  
Ensaio lítico, 20  
Teste de imunofluorescência, 21  
Técnicas com marcadores radioativos, 24  
Técnicas imunoenzimáticas, 27  
Ensaio quimioluminescente, 36  
Microscopia imunoeletrônica, 37  
Ensaio imunocromatográfico, 39  
Técnicas empregadas na automação, 41  
Bibliografia, 48

### 3 Diagnóstico Molecular, 54

Referências bibliográficas, 57

## Seção 2 | Vírus, 59

### 4 Citomegalia, 61

Introdução, 62  
Características do vírus, 62  
Aspectos clínicos e epidemiológicos, 62  
Diagnóstico laboratorial, 63  
Correlação clínico-laboratorial, 65  
Referências bibliográficas, 67

### 5 Dengue, 69

Diagnóstico laboratorial, 70  
Bibliografia, 72

### 6 Hepatites Virais, 73

Hepatite A, 74  
Hepatite B, 76  
Hepatite C, 82  
Hepatite delta, 87  
Vírus da hepatite E, 89  
Hepatites não A, não B, não C, não D, não E (não A-E), 91  
Sumário do diagnóstico laboratorial das hepatites virais, 92  
Referências bibliográficas, 94

### 7 Infecção por HIV, 97

Considerações gerais em virologia e biologia molecular, 98  
Epidemiologia, 103  
Fármacos antirretrovirais, 105  
Diagnóstico laboratorial, 108  
Bibliografia, 110

### 8 Infecção por HPV, 113

Introdução, 114  
Diagnóstico laboratorial, 116  
Referências bibliográficas, 119

### 9 Infecção por HTLV-I e HTLV-II, 120

Agente etiológico, 121  
Resposta imunológica à infecção por HTLV, 122  
Patogênese e manifestações clínicas, 122  
Epidemiologia, 123  
Diagnóstico, 125  
Referências bibliográficas, 131

### 10 Mononucleose Infecciosa, 135

Introdução, 136  
Epidemiologia e transmissão, 136  
Características do vírus, 137  
Diagnóstico laboratorial, 138  
Referências bibliográficas, 140

### 11 Rubéola, 142

Introdução, 143  
Epidemiologia, 143  
Aspectos clínicos, 145  
Vírus da rubéola e seus antígenos, 146  
Resposta imune à infecção e interpretação clínica dos resultados, 147  
Diagnóstico laboratorial, 150  
Referências bibliográficas, 152



## Seção 3 | Bactérias, 155

### 12 Enterococcias, 157

Introdução, 158  
Microbiologia, 158  
Significado clínico e epidemiologia, 162  
Interpretação do diagnóstico laboratorial, 166  
Considerações finais, 166  
Bibliografia, 166

### 13 Estafilococcias, 170

Introdução, 171  
Infecções por estafilococos resistentes à meticilina, 171  
Taxonomia e descrição do gênero *Staphylococcus*, 172  
Resistência a antimicrobianos, 176  
Tendências sobre métodos laboratoriais de isolamento e identificação, 180  
Referências bibliográficas, 181

### 14 Streptococcias, 183

Classificação geral e etiopatogenia, 184  
*Streptococcus pyogenes*, 184  
*Streptococcus agalactiae*, 187  
*Streptococcus pneumoniae*, 189  
Vacinas, 190  
Referências bibliográficas, 191

### 15 Infecções por Clamídias e Clamidófilas, 194

Introdução, 195  
Métodos laboratoriais de diagnóstico, 200  
Interpretação e repercussão dos resultados, 204  
Bibliografia, 204

### 16 Infecção por Micoplasmas, 206

Introdução, 207  
Micoplasmas humanos de interesse clínico, 208  
Referências bibliográficas, 216

### 17 Leptospirose Humana, 218

Introdução, 219  
Diagnóstico laboratorial, 220  
Bibliografia, 225

### 18 Meningites Bacterianas Agudas, 227

Introdução, 228  
Diagnóstico, 229  
Tratamento, 230  
Diagnóstico diferencial, 232  
Evolução, 232  
Bibliografia, 233

### 19 Sífilis, 234

Introdução, 235  
Diagnóstico laboratorial, 235  
Utilização e interpretação dos testes para sífilis, 237  
Referências bibliográficas, 240

### 20 Tuberculose, 242

Introdução, 243  
Diagnóstico clínico-laboratorial, 244  
Micobacterioses, 248  
Referências bibliográficas, 252

## Seção 4 | Protozoários, 255

### 21 Amebíase, 257

Introdução, 258  
Diagnóstico laboratorial, 259  
Diferenciação das amebas parasitos do trato intestinal, 265  
Conclusão, 266  
Bibliografia, 267

### 22 Doença de Chagas, 268

Introdução, 269  
Aspectos clínicos e epidemiológicos, 270  
Diagnóstico de laboratório, 271  
Padronização do diagnóstico de laboratório da doença de Chagas, 275  
Bibliografia, 276

### 23 Leishmanioses, 277

Introdução, 278  
Diagnóstico da leishmaniose visceral, 278  
Diagnóstico da leishmaniose tegumentar, 280  
Bibliografia, 282

### 24 Malária, 283

Introdução, 284  
Diagnóstico clínico, 286  
Diagnóstico de laboratório, 286  
Malária transmitida por transfusão, 295  
Conclusão, 296  
Referências bibliográficas, 297

### 25 Protozooses Emergentes, 300

Introdução, 301  
*Cryptosporidium* spp., 301  
*Cyclospora cayentanensis*, 301  
Microsporídeos, 302  
Referências bibliográficas, 303

### 26 Toxoplasmose, 304

Aspectos epidemiológicos e parasitológicos, 305  
Aspectos clínicos, 305  
Diagnóstico laboratorial, 305  
Referências bibliográficas, 313

## Seção 5 | Helmintos, 317

### 27 Esquistossomose Mansônica, 319

Introdução, 320  
Diagnóstico laboratorial, 320  
Considerações finais, 325  
Referências bibliográficas, 325



## **28 Filariose Bancroftiana, 329**

Introdução, 330  
Correlação clínico-laboratorial, 330  
Diagnóstico da infecção ativa, 333  
Linfocintigrafia, 335  
Referências bibliográficas, 335

## **29 Hidatidose, 337**

Introdução, 338  
Etiologia, 338  
Epidemiologia, 339  
Diagnóstico, 340  
Bibliografia, 345

## **30 Neurocisticercose, 347**

Introdução, 348  
Imunobiologia da neurocisticercose humana, 348  
Aspectos clínico-epidemiológicos, 348  
Diagnóstico da neurocisticercose, 349  
Considerações finais, 350  
Bibliografia, 350

## **31 Toxocaríase, 351**

Introdução, 352  
Gênero *Toxocara*, 352  
Epidemiologia, 352  
Manifestações clínicas, 353  
Alterações laboratoriais, 354  
Tratamento, 354  
Diagnóstico, 355  
Perspectivas, 360  
Referências bibliográficas, 360

## **Seção 6 | Fungos, 363**

### **32 Infecções Fúngicas, 365**

Introdução, 366  
Qualidade em laboratório de micologia, 367  
Exames micológicos, 368  
Identificação de culturas de fungos, 376  
Metodologias auxiliares de diagnóstico micológico, 385  
Micoses superficiais, 393  
Micoses cutâneas, 397  
Micoses cutâneas e sistêmicas, 403  
Fungos dimórficos causadores de micoses sistêmicas, 416  
Fungos demácios, 431  
Outras micoses, 438  
Bibliografia, 440

## **Seção 7 | Alergias, 447**

### **33 Doenças Alérgicas, 449**

Introdução, 450  
Diagnóstico das alergias, 450  
Bibliografia, 457

## **Seção 8 | Doenças Autoimunes, 459**

### **34 Doenças Autoimunes Sistêmicas, 461**

Introdução, 462  
Métodos de detecção, 462  
Interpretação dos testes laboratoriais em situações clínicas específicas, 465  
Referências bibliográficas, 470

## **Índice Alfabético, 471**







# Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes

---

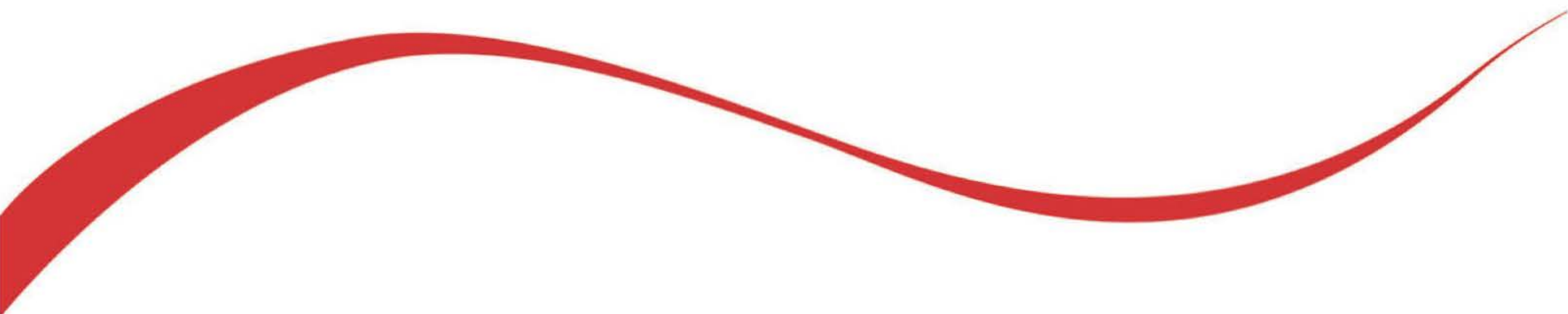
Correlações Clínico-Laboratoriais







# Seção 1 | Metodologia Geral





- Capítulo 1 | Sorologia | Importância e Parâmetros, 3
- Capítulo 2 | Testes Sorológicos, 12
- Capítulo 3 | Diagnóstico Molecular, 54



# Capítulo 1

---

## Sorologia | Importância e Parâmetros

*Antonio Walter Ferreira e  
Sandra do Lago Moraes*

- Importância dos testes sorológicos na patologia clínica, 4
- Importância da pesquisa de anticorpos no diagnóstico individual, 4
- Importância da pesquisa de anticorpos em inquéritos soropidemiológicos, 5
- Importância da pesquisa de antígenos, 6
- Parâmetros para validação de um teste diagnóstico, 6
- Aplicação de testes diagnósticos, 10
- Bibliografia, 11



## ► Importância dos testes sorológicos na patologia clínica

O diagnóstico de certeza de um processo infeccioso é a demonstração do patógeno ou de seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros; porém, nem sempre isso é possível, seja pela ausência do agente infeccioso, pela falta de sensibilidade dos métodos utilizados, por falhas técnicas ou pelos longos períodos exigidos para uma resposta do laboratório. Os métodos imunológicos diretos ou indiretos têm sido amplamente utilizados para suprirem as deficiências dos métodos parasitológicos ou microbiológicos, na pesquisa de antígenos, anticorpos ou imunocomplexos, em função de sua rapidez, simplicidade de execução, possibilidade de automação e seu baixo custo operacional. O conhecimento da aplicação dos testes sorológicos e a interpretação correta dos resultados obtidos são fundamentais para clínicos, patologistas e laboratoristas orientarem o seu trabalho, visando ao diagnóstico correto, associando sempre os resultados obtidos às investigações clínicas e epidemiológicas. Na pesquisa de anticorpos, os testes sorológicos têm sido utilizados com sucesso, como auxiliares importantes no diagnóstico individual ou em inquéritos soroepidemiológicos, graças às múltiplas possibilidades com que podem ser empregados.

## ► Importância da pesquisa de anticorpos no diagnóstico individual

### ▪ Elucidação de processos patológicos com sintomas e sinais clínicos confundíveis

Como exemplo, são citadas, entre outras patologias, toxoplasmose e mononucleose infecciosa, toxoplasmose e rubéola, sífilis secundária e dermatovirose ou processos alérgicos e hepatites B e C. A pesquisa de anticorpos específicos por testes rigorosamente padronizados é de grande valia na definição da suspeita clínica principal.

### ▪ Diferenciação da fase da doença

Em algumas patologias, principalmente as que provocam fetopatias, como toxoplasmose, sífilis, citomegalia, rubéola, doença de Chagas, a detecção de diferentes classes de imunoglobulinas específicas ao agente infeccioso na circulação dos pacientes é importante na identificação da fase da infecção. A mudança da classe de imunoglobulina ocorre durante a resposta imune, seguindo uma ordem geneticamente determinada. Assim, a imunoglobulina IgM é a primeira a ser formada, sendo normalmente encontrada nos processos agudos, enquanto a imunoglobulina IgG encontrada no final dos processos agudos permanece durante longos períodos na circulação do hospedeiro, como imunoglobulina de memória, estando muitas vezes relacionada com a proteção do indivíduo. Em algumas infecções, como na toxoplasmose ou na citomegalia, outras imunoglobulinas como a IgE e a IgA específicas têm sido estudadas, uma vez que o período de permanência na circulação após o início do processo infeccioso é menor do que o da imunoglobulina IgM, fornecendo maior precisão da fase aguda da doença. Dada a importância dessa pesquisa, resultados falso-positivos ou negativos devem

ser evitados, bem como a correta interpretação dos resultados deve ser devidamente conhecida. Métodos sorológicos com base na avidéz ou afinidade funcional dos anticorpos IgG já estão sendo utilizados para a avaliação da fase recente de diferentes patologias. Na toxoplasmose a utilização dessa metodologia tem permitido caracterizar com maior precisão a fase recente da doença, evitando falsas interpretações. Quando são utilizados métodos mais sensíveis, anticorpos IgM anti-*T. gondii* residuais permanecem por períodos superiores àqueles detectados por imunofluorescência indireta. A associação de testes, inclusive a avidéz de anticorpos IgG, tem definido novos perfis na toxoplasmose.

### ▪ Diagnóstico de doença congênita

A propriedade da imunoglobulina IgM de não atravessar a barreira placentária tem desempenhado papel importante na definição de doenças congênitas. Os achados de anticorpos IgM anti-*T. pallidum* no sangue de cordão umbilical, no momento do parto, têm sido considerados patognomônicos de sífilis congênita. Anticorpos IgG anti-*T. pallidum* após o nascimento podem indicar um processo infeccioso congênito ou estar simplesmente relacionados com a transmissão materno-fetal dessa imunoglobulina, que permanece na circulação do recém-nascido até o 5º ou 6º mês de vida. O acompanhamento do recém-nascido por vários meses e a diminuição seguida do aumento gradual dessa imunoglobulina indicam a doença congênita. Essa definição tardia, entretanto, prejudica o tratamento, que já deveria ter sido instituído. A sensibilidade dos métodos de detecção de anticorpos IgM e a correta interpretação dos resultados são fundamentais nessa pesquisa.

### ▪ Seleção de doadores de sangue

No Brasil, há normas técnicas determinadas pelo Ministério da Saúde para seleção de doadores de sangue. Além das triagens clínica e epidemiológica, a triagem sorológica tem um papel de destaque na prevenção da doença transfusional para doença de Chagas, sífilis, hepatites B e C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e HTLV-I e II. Os testes utilizados devem apresentar alta sensibilidade, e a associação de dois ou mais testes de princípios diferentes tem sido recomendada em normas técnicas pelo Ministério da Saúde como alternativa para obtenção de índices máximos de sensibilidade e especificidade no resultado final. Muito se tem discutido sobre os critérios de seleção quando são utilizados testes que pesquisam anticorpos IgG contra determinados patógenos. O enfoque da discussão é relevante, pois muitas vezes os achados desses anticorpos referem-se a infecções passadas e já tratadas, não implicando risco transfusional. Na impossibilidade de outros meios de seleção, e enquanto o método reação em cadeia da polimerase (PCR – *polimerase chain reaction*) não é integralmente padronizado para uso rotineiro dos bancos de sangue, os testes sorológicos continuam desempenhando sua função de selecionar doadores, mesmo nos casos em que o patógeno já não está na circulação dos doadores.

### ▪ Seleção de doadores e receptores de órgãos para transplantes

Anticorpos altamente específicos para determinantes estruturais individuais que caracterizam diferentes antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (sistema HLA)



são utilizados em testes de linfocitotoxicidade. A reação entre antígenos encontrados nos linfócitos e os soros que contêm anticorpos específicos anti-HLA torna possível identificar quais são os antígenos HLA expressos por diferentes indivíduos. A tipagem desses antígenos é importante na seleção de doadores e receptores de órgãos em transplantes.

### ▪ Avaliação do prognóstico da doença

Anticorpos contra determinados componentes antigênicos de microrganismos podem ser utilizados como marcadores imunológicos para avaliação do prognóstico de uma doença. Tomando-se como exemplo a hepatite B, componentes estruturais do vírus induzem a formação de anticorpos que são utilizados como marcadores imunológicos na avaliação dos pacientes. Um antígeno solúvel, denominado antígeno HBe (HBeAg), relacionado com a infectividade e contagiosidade do vírus, induz a formação de anticorpos anti-HBe, que surgem na circulação do paciente, como primeiro marcador de recuperação de um processo patológico crônico e tem sido utilizado inclusive na avaliação da eficácia de  $\alpha$ -interferon como agente quimioterápico. A ausência desse marcador durante a evolução do processo crônico é sempre um mau prognóstico da doença. Também na paracoccidiodomicose, a associação das respostas humoral e celular tem sido utilizada não apenas na avaliação do prognóstico da doença, mas também para avaliar a resposta à quimioterapia instituída. Resposta humoral em altos títulos, com resposta celular ausente, indica um mau prognóstico da doença e ausência de resposta medicamentosa.

### ▪ Avaliação da eficácia da terapêutica e da suspensão da terapêutica

O sucesso da terapêutica pode acompanhar-se de queda gradual dos anticorpos na circulação dos pacientes. Essa propriedade tem sido utilizada em muitas patologias para avaliar a eficácia e a suspensão da terapêutica instituída. No caso da sífilis, anticorpos anticardiolipina detectados no teste do VDRL têm queda gradual quando a terapêutica é bem-sucedida, fato não observado para os anticorpos antitreponêmicos, que permanecem na circulação por longos períodos, de meses a anos, mesmo após a cura do paciente. Deve-se ficar atento à sorologia da sífilis, pois muitas vezes um resíduo de anticorpos anticardiolipina em títulos baixos (1/2, 1/4), por períodos maiores que 2 meses, indica a cura do paciente e possibilidade da suspensão da terapêutica.

### ▪ Avaliação da imunidade específica naturalmente adquirida ou artificialmente induzida

Anticorpos IgG específicos para componentes antigênicos de um determinado microrganismo podem ser utilizados como marcadores de imunidade específica de um indivíduo a esse microrganismo. Em algumas patologias, como as viroses, não é difícil definir qual o melhor imunógeno a ser utilizado. Quanto mais complexa for a constituição antigênica do patógeno, mais difícil será a definição do componente estrutural alvo para a produção da vacina. Parasitos, como plasmódios, leishmânias etc., têm sido exaustivamente estudados durante muitos anos, mas, somente agora, com o advento da biologia molecular, resultados promissores têm sido alcançados, principalmente quando são associadas as respostas celular e humoral dos indivíduos.

Níveis de anticorpos protetores determinados por testes sorológicos altamente sensíveis e específicos têm importância fundamental na avaliação da imunidade do indivíduo. Citem-se como exemplos a rubéola, a difteria e o tétano.

Na rubéola, o teste feito em sistemas automatizados possibilita estabelecer com rigor os níveis de anticorpos protetores em unidades internacionais. Assim, níveis inferiores a 20 UI/ml são interpretados como negativos (ausência de anticorpos); níveis entre 20 e 30 UI/ml são interpretados como anticorpos presentes, porém não protetores; e níveis maiores de 30 UI/ml são interpretados como anticorpos presentes e protetores. O exemplo mostra claramente a necessidade de testes altamente sensíveis e específicos para detecção de pequenas quantidades de anticorpos, que, na clínica médica, têm grande importância.

### ▪ Agravamento da patologia

Os achados de autoanticorpos durante a evolução de um processo patológico estão relacionados com o agravamento da patologia. Nos casos graves de esquistossomose, hepatite B, malária etc., observam-se anticorpos contra estruturas do próprio indivíduo. Imunocomplexos depositados em nível de glomerulos também podem representar um agravamento da patologia e ser facilmente detectados por testes sorológicos, como, por exemplo, imunofluorescência indireta anticomplemento.

## ► Importância da pesquisa de anticorpos em inquéritos soroepidemiológicos

### ▪ Prevalência da doença

A prevalência da doença pode ser estabelecida pela pesquisa de anticorpos IgG em amostras de sangue coletadas com rigoroso critério epidemiológico. Na década de 1970, foi elaborado um trabalho conjunto entre o Ministério da Saúde e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP), para se estabelecer a prevalência da doença de Chagas no país pela pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. O trabalho teve êxito pela associação de laboratórios de vários estados brasileiros credenciados pelo IMT-SP e após intenso treinamento dos técnicos envolvidos no projeto. O Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo orientou a coleta do material, seguindo padrões estatísticos definidos, e o Ministério da Saúde garantiu todo o apoio logístico para o trabalho de campo. O somatório de esforços possibilitou o conhecimento do número de indivíduos infectados e serviu de base para ações ministeriais; foi o maior inquérito sorológico já realizado em todos os tempos.

### ▪ Erradicação da doença

A erradicação de determinada doença em uma região pode ser verificada por testes sorológicos. A ausência de anticorpos contra o patógeno em crianças nascidas no local expostas às condições ambientais é forte indício da erradicação da doença. O acompanhamento sorológico dessas crianças por um período de tempo é necessário para confirmação dos resultados. Foi realizado um novo inquérito epidemiológico para determinação da prevalência da doença de Chagas em



crianças de 0 a 5 anos, durante o período de 2001 a 2008. Os resultados mostraram diminuição significativa da transmissão vetorial e pouca transmissão vertical.

### ▪ Reintrodução de novos casos em áreas consolidadas

Achados de anticorpos IgM ou aumento do título de anticorpos IgG contra determinado patógeno são indícios da reintrodução de uma doença em áreas onde ela já estava erradicada. Dessa maneira, o monitoramento sorológico de uma determinada área, desde que realizado com rigor técnico e reagentes bem padronizados, possibilita ações corretivas que evitem novos focos, fazendo parte de um programa de vigilância sanitária.

## ► Importância da pesquisa de antígenos

### ▪ Critério de cura

A ausência do patógeno ou de seus produtos após um processo infeccioso está diretamente relacionada com a cura do paciente. Os testes sorológicos utilizados para definição dessa possibilidade devem apresentar elevados níveis de sensibilidade e especificidade por meio da utilização de anticorpos altamente específicos em técnicas rigorosamente padronizadas.

### ▪ Definição da etiologia da doença

O encontro do patógeno no hospedeiro define o processo infeccioso. Essa pesquisa, atualmente feita com sucesso pela reação em cadeia da polimerase (PCR), tem de ser rigorosamente avaliada para que não sejam cometidos erros de interpretação. Patologistas franceses, estudando biopsias de gânglios de pacientes selecionados ao acaso, encontraram toxoplasmas. O estudo retrospectivo desses pacientes mostrou que, em muitos casos, não havia relato de toxoplasmose, supondo-se um equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro. Os métodos imunológicos ou a PCR, por serem muito sensíveis, podem detectar reações positivas sem implicação com a doença do hospedeiro.

### ▪ Seleção de doadores de sangue

Selecionar doadores de sangue pela pesquisa do agente etiológico de uma patologia passível de ser transmitida por transfusão de sangue é uma meta importante no diagnóstico. Essa pesquisa, indicativa de um processo agudo, poderia ser utilizada mesmo na fase em que a pesquisa de anticorpos ainda é negativa, fase pré-sorológica. Os testes devem apresentar níveis máximos de sensibilidade e especificidade. Como exemplo, cita-se a pesquisa do antígeno de superfície da hepatite B, HBsAg. A dificuldade dessa pesquisa por métodos imunológicos para outros microrganismos, como os parasitos, está na definição do antígeno-alvo a ser estudado, pela complexidade antigênica e pela falha, em muitos casos, da resposta imune a esses epitopos selecionados. Desse modo, os métodos moleculares para pesquisa do DNA são os mais promissores.

### ▪ Inquéritos epidemiológicos

Embora mais restrita, essa aplicação tem sido utilizada por muitos laboratórios. Em 1985, foi realizado um projeto em colaboração com a Dra. Ruth Nussenzweig do laboratório de parasitologia do Centro Médico da Universidade de Nova York (New York University Medical Center [NYUMC]), para pesquisa de esporozoítos em mosquitos capturados na região amazônica, por teste imunoenzimático com anticorpos monoclonais antiesporozoítos de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Os resultados serviram para mapear as regiões transmissoras de malária e identificar as espécies infectantes. Trabalhos semelhantes foram realizados por outros autores em diferentes regiões do mundo.

Pelo exposto, fica claro que os testes sorológicos desempenham um papel fundamental na patologia clínica como auxiliares no diagnóstico de uma suspeita clínica principal. Devemos lembrar, entretanto, que os resultados obtidos podem variar em função de uma série de fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro e com as variações antigênicas do patógeno. Esses fatores podem levar a resultados falso-positivos pela possibilidade de reações cruzadas contra determinantes antigênicos comuns encontrados nos parasitos, contra antígenos ubíquios ou em razão de uma resposta exacerbada do hospedeiro pela ativação policlonal de células B ou a resultados falso-negativos pela ausência de resposta imunológica contra epitopos dos parasitos.

Todos os ramos da ciência médica caminham na busca incessante de um teste ou de um processo de referência que possa definir a presença ou a ausência da doença no paciente, ou seja, um teste padrão-ouro (do inglês, *gold standard test*). Contudo, os fatores anteriormente relacionados e outros parâmetros a serem ainda discutidos devem ser rigorosamente analisados para que a definição do processo infeccioso seja a mais próxima do verdadeiro estado clínico do paciente.

## ► Parâmetros para validação de um teste diagnóstico

Vários parâmetros devem ser analisados para a validação de um teste diagnóstico. A validade intrínseca de um teste, que é o desempenho do teste quando comparado a um teste de referência, pode ser avaliada por parâmetros como sensibilidade, especificidade e eficiência. Estes são característicos do teste, e não da população em que está sendo aplicado; portanto, fornecem resultados consistentes independentemente da prevalência da doença. Já os valores preditivos dos resultados positivos e negativos do teste são parâmetros que dependem da prevalência da doença na população em estudo. A validade extrínseca é a capacidade do teste em detectar a real situação da população em relação à doença que está sendo estudada e também o desempenho do teste em uma determinada população e pode ser avaliada por parâmetros como reprodutibilidade, acurácia e precisão.

### ▪ Parâmetros intrínsecos

Muito importante na definição dos parâmetros intrínsecos é a amostragem a ser utilizada. Devemos selecionar populações de indivíduos sabidamente doentes e não doentes para cuja finalidade diagnóstica o teste se destina. Por exemplo, ao se padronizarem testes para o diagnóstico da doença de Chagas,



devem-se escolher como indivíduos doentes aqueles que apresentem alterações clínicas e xenodiagnóstico positivo. Para evitar problemas de resultados falso-positivos, deve-se selecionar como indivíduos não doentes aqueles residentes em áreas endêmicas da doença, sem alterações clínicas e com xenodiagnóstico negativo. Evidentemente, para selecionar os indivíduos doentes, deve-se levar em consideração as diferentes fases do processo infeccioso e coletar as amostras de sangue dessas fases, para avaliação do comportamento global do teste. Como a sensibilidade do xenodiagnóstico é muito baixa na fase crônica da doença, outros fatores deverão ser considerados na seleção das amostras de sangue, como a epidemiologia e os achados clínicos e laboratoriais.

Para a definição dos parâmetros de validação intrínseca de um teste, foi utilizada uma tabela de dupla entrada, relacionando a presença ou não de doença e os resultados obtidos no teste em estudo, positivo ou negativo (Quadro 1.1). Assim, são apresentadas quatro possibilidades de resultados: (1) *verdadeiro-positivo* (VP), quando o resultado do teste é positivo na presença de doença; (2) *falso-positivo* (FP), quando o resultado é positivo na ausência de doença; (3) *verdadeiro-negativo* (VN), quando o resultado é negativo na ausência de doença; (4) *falso-negativo* (FN), quando o resultado é negativo na presença de doença.

### Sensibilidade

A sensibilidade de um teste refere-se à porcentagem de resultados positivos pelo teste na população de doentes, ou seja, a proporção de resultados verdadeiro-positivos. Esse conceito é diferente da sensibilidade da técnica, que mede o limiar de detecção, definido pela visualização direta ou indireta da reação antígeno e anticorpo, que, muitas vezes, não é aplicada para fins de diagnóstico.

Utilizando os dados do Quadro 1.1 podemos estabelecer a sensibilidade do teste em estudo, pela relação:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN}$$

### Especificidade

A especificidade de um teste sorológico é definida pela porcentagem de resultados negativos pelo teste nos indivíduos não doentes, ou seja, a proporção dos verdadeiro-negativos. A especificidade do teste pode ser influenciada por inúmeros fatores que levam a resultados falso-positivos. Anticorpos naturais e heteroanticorpos, normalmente IgM contra diferentes epitopos, levam a resultados falso-positivos do teste de hemaglutinação para o diagnóstico da doença de Chagas. Indivíduos polinfetados por parasitos intestinais apresentam um somatório de componentes antigênicos que induzem a formação de anticorpos que cruzam com inúmeros antígenos-alvo dos testes sorológicos. Condutas laboratoriais, como a

utilização de reagentes químicos, são empregadas para minimizar o problema dos resultados falso-positivos. Por exemplo, a utilização de 2-mercaptoetanol, para diluir amostras de soro, elimina anticorpos IgM sem prejuízo na detecção dos anticorpos IgG.

Atualmente, para melhorar a especificidade dos testes, epitopos de microrganismos obtidos por recombinação genética ou síntese peptídica têm sido utilizados. Esse procedimento pode levar a perda na sensibilidade dos testes.

Utilizando os dados do Quadro 1.1, podemos estabelecer a especificidade de um teste sorológico pela relação:

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Em muitas ocasiões, é difícil, para o laboratorista que deseja garantir a qualidade do seu trabalho, a seleção de uma amostragem confiável para a definição dos parâmetros de sensibilidade e especificidade. Nesse caso, costuma-se relacionar os resultados do teste que está sendo padronizado com um teste referência. Nesse caso, os índices obtidos serão de *sensibilidade relativa* ou *copositividade* e *especificidade relativa* ou *conegatividade*. Para estabelecer esses valores, deve-se levar em conta a sensibilidade e a especificidade do método de referência.

### Eficiência

A eficiência do teste sorológico refere-se à relação entre o somatório dos resultados verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos com a população estudada. Evidentemente, quanto mais próximo de 1, melhor será o teste em estudo.

Pelos dados do Quadro 1.1, pode-se estabelecer a eficiência de um teste como sendo:

$$\text{Eficiência} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

## ■ Parâmetros que dependem da prevalência da doença

Os valores preditivos dos resultados positivos ou negativos dependem não apenas da sensibilidade e da especificidade do teste, como também da prevalência da doença que está sendo diagnosticada na população em estudo.

*Prevalência* pode ser definida como a porcentagem de indivíduos doentes em uma população. São considerados indivíduos doentes os verdadeiro-positivos somados aos falso-negativos (VP + FN).

$$\text{Prevalência} = \frac{VP + FN}{VP + VN + FP + FN}$$

Definimos como *prevalência sorológica* a porcentagem de casos positivos pelo teste (VP + FP) em uma população.

$$\text{Prevalência sorológica} = \frac{VP + FP}{VP + VN + FP + FN}$$

Dos conceitos anteriormente mencionados, pode-se estabelecer a *prevalência verdadeira*, definida como a relação entre a prevalência sorológica somada à especificidade menos 1, e a sensibilidade somada à especificidade menos 1.

$$\text{Prevalência verdadeira} = \frac{Ps + E - 1}{S + E - 1}$$

**Quadro 1.1 - Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.**

Teste	Doença   Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro-positivos (VP)	Falso-positivos (FP)
Negativo	Falso-negativos (FN)	Verdadeiro-negativos (VN)
Total	VP + FN	FP + VN



### Valor preditivo de um resultado positivo

O valor preditivo de um resultado positivo (VPP) pode ser calculado pela proporção de indivíduos doentes entre os resultados positivos obtidos no teste em estudo; portanto, refere-se à probabilidade de doença quando o resultado do teste é positivo.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

### Valor preditivo de um resultado negativo

O valor preditivo de um resultado negativo (VPN) pode ser calculado pela proporção de indivíduos não doentes entre os resultados negativos do teste em estudo; portanto, refere-se à probabilidade de não ocorrência de doença quando o resultado do teste é negativo.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

As expressões citadas são derivadas simplificadas do *teorema de Bayes* (definido adiante). O *teorema de Bayes* é uma expressão algébrica que possibilita calcular os valores preditivos dos resultados positivos e negativos; ou seja, a probabilidade da ocorrência ou não da doença, quando são conhecidas a prevalência da doença e a sensibilidade e a especificidade do teste que está sendo utilizado.

Considerando as definições de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e prevalência feitas a partir do Quadro 1.1, e que esses valores são probabilidades e variam de 0,00 a 1,00, pode-se dizer que:

$$VP = \text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}$$

$$FN = (1 - \text{Sensibilidade}) \times \text{Prevalência}$$

$$VN = \text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência})$$

$$FP = (1 - \text{Especificidade}) \times (1 - \text{Prevalência})$$

Portanto, pelas definições de VPP e VPN:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} =$$

$$\frac{\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}}{(\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}) + (1 - \text{Especificidade}) \times (1 - \text{Prevalência})}$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} =$$

$$\frac{\text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência})}{[\text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência})] + [(1 - \text{Sensibilidade}) \times \text{Prevalência}]}$$

Com os parâmetros anteriormente referidos, é possível calcular os VPP e VPN de um teste, cujos índices de sensibilidade e especificidade são conhecidos, quando ocorre variação na prevalência. Exemplificando, quais seriam os VPP e VPN de um teste, com índices de 95% de sensibilidade e 95% de especificidade no diagnóstico de uma doença com 1% (Quadro 1.2) e 20% (Quadro 1.3) de prevalência, respectivamente, e com uma amostragem de 2.000 indivíduos?

Conforme demonstrado, quanto maior a prevalência da doença, maior será o valor preditivo de um resultado positivo do teste, e, quanto menor a prevalência, maior será o valor preditivo de um resultado negativo do teste.

### Chance ou odds

O teorema de Bayes possibilita relacionar a probabilidade pré-teste (que é a prevalência da doença) com a probabilidade pós-teste (que é o valor preditivo positivo do teste). Também é útil quando expresso em termos de chance (*odds*) de um

**Quadro 1.2 - Resultados de um teste com índices de 95% de sensibilidade e 95% de especificidade no diagnóstico de uma doença com 1% de prevalência em uma população de 2.000 indivíduos.**

Teste	Doença   Diagnóstico verdadeiro		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	19	99	118
Negativo	1	1.881	1.882
Total	20	1.980	2.000

A partir dos dados apresentados, temos:  $VPP = \frac{19}{118} = 0,16$  ou 16% e  $VPN = \frac{1.881}{1.882} = 0,999$  ou 99,9%.

**Quadro 1.3 - Resultados de um teste com índices de 95% de sensibilidade e 95% de especificidade no diagnóstico de uma doença com 20% de prevalência em uma população de 2.000 indivíduos.**

Teste	Doença   Diagnóstico verdadeiro		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	380	80	460
Negativo	20	1.520	1.540
Total	400	1.600	2.000

A partir dos dados apresentados, temos:  $VPP = \frac{380}{460} = 0,82$  ou 82% e  $VPN = \frac{1.520}{1.540} = 0,98$  ou 98%.



evento, mais do que de probabilidade. A chance ou *odds* de um evento acontecer é expressa pela relação:

$$\text{Chance (odds)} = \frac{P}{(1 - P)}$$

em que P é igual à probabilidade.

Por exemplo, a probabilidade de 80% corresponde a quatro chances de doença contra uma chance de não doença, segundo essa fórmula, pois:  $P = 80\% = 0,8$  (corresponde à chance =  $0,8/1 - 0,8 = 4$ ). Chance ou *odds* e probabilidade são relacionados, mas os números não são idênticos. A chance ou *odds* é expressa como frações com número 1 no denominador, e a probabilidade é expressa como uma fração decimal variando de zero a um, ou como um percentual.

Ao multiplicar a chance de um evento pré-teste pela *likelihood ratio* (LR) ou taxa de probabilidade, pode-se calcular a chance do evento pós-teste.

Chance de doença pós-teste = chance de doença pré-teste  $\times$  LR

A LR é uma medida potente da precisão de um teste. A LR para um resultado de um teste indica como o resultado obtido com esse teste pode aumentar ou diminuir a probabilidade de doença. É expressa por relações quando os dados avaliados são expressos em sensibilidade e especificidade.

$$\text{LR do resultado positivo (+)} = \frac{\text{Sensibilidade}}{1 - \text{Especificidade}}$$

$$\text{LR do resultado negativo (-)} = \frac{1 - \text{Sensibilidade}}{\text{Especificidade}}$$

As LR são estáveis em relação às mudanças na prevalência da doença, diferentemente dos valores preditivos, que dependem da prevalência da doença na população. Utilizando os dados do Quadro 1.1, podem-se expressar as LR como:

$$\text{LR (+)} = \frac{\text{VP}/(\text{VP} + \text{FN})}{\text{FP}/(\text{FP} + \text{VN})}$$

$$\text{LR (-)} = \frac{\text{FN}/(\text{VP} + \text{FN})}{\text{VN}/(\text{FP} + \text{VN})}$$

Para mais bem compreender esses parâmetros, segue um exemplo, conforme publicado por Gambino, 1991: Imagine um teste para a doença de Chagas que apresente as seguintes características: sensibilidade de 98% e especificidade de 98%. Aplica-se, então, esse teste para uma população de banco de sangue de áreas não endêmicas do Brasil (10.000 indivíduos) com baixa prevalência ( $P = 0,5\%$ ) (Quadro 1.4).

Com esses dados, podem-se calcular os valores preditivos positivo e negativo.

$$\text{VPP} = \frac{19}{118} = 19,8\%$$

$$\text{VPN} = \frac{9.751}{9.752} = 99,98\%$$

É óbvio que o valor preditivo positivo é baixo, mas se forem considerados outros parâmetros, é possível chegar à conclusão de que, embora seja baixo, o VPP = 19,8% é muito bom. O exemplo dado por Gambino é ótimo e facilita a compreensão dos dados apresentados no Quadro 1.4. Imagine o teste aplicado para selecionar cavalos de raça como potenciais vencedores de corridas. A primeira probabilidade (pré-teste) de acertar um cavalo vencedor ao acaso entre 10.000 cavalos é somente de 0,005 (prevalência de 0,5%). A chance (*odds*) de acerto é dada por:

$$\text{Chance (odds)} = \frac{P}{1 - P} = \frac{0,005}{1 - 0,005} = 0,00502$$

A chance de acerto (chance pré-teste) é de 0,00502 para 1. Muito pequena para um apostador que deseja ganhar. Para aumentar a chance do apostador ganhar, aplica-se o teste nos 10.000 cavalos e tem-se um novo valor, que é dado pelo total de positivos no teste, ou seja, 248. Esse número representa o total de cavalos selecionados pelo teste com potencial de vencer. Mas, como os verdadeiro-positivos são 49, isso significa que apenas 49 serão vencedores. A probabilidade antes da aplicação do teste (que é a prevalência da doença) era de  $1/200$ . Aplicando-se o teste, a probabilidade passa a ser de  $49/248 = 1/5$ ; ou seja, de 20%.

A chance de acerto, que era de 0,00502 para 1, passou a ser de 0,25 para 1!

$$\text{Chance (odds)} = \frac{248}{1 - 248} = 0,0254$$

$$\text{Chance (odds) pós-teste} = 0,0254/0,00502 = 5$$

Conhecendo a LR(+), pode-se, facilmente, converter a chance que o apostador tinha (pré-teste) em chance após o teste, por simples multiplicação.

$$\text{Chance (odds) pós-teste} = \text{chance (odds) pré-teste} \times \text{LR}$$

No exemplo, chance pré-teste: 0,005 para 1; chance pós-teste: 0,25 para 1 (o que significa um aumento de 50 vezes).

Alguns outros parâmetros extrínsecos devem ser considerados na validação de um teste, como precisão, acurácia ou exatidão e reprodutibilidade.

## ■ Parâmetros extrínsecos

### Precisão

Precisão é um parâmetro que determina existir concórdia dos resultados obtidos quando um mesmo teste é feito várias vezes; mede o erro acidental do método, que corresponde ao erro experimental acumulado.

### Acurácia ou exatidão

É um parâmetro que determina a capacidade do teste em fornecer resultados muito próximos ao verdadeiro valor do que se está medindo. A medida da exatidão torna possível detectar erro sistemático ou tendência dos resultados de se desviarem em uma dada direção e proporção em relação ao valor real.

**Quadro 1.4** - Dados da aplicação de um teste com sensibilidade de 98%, especificidade de 99%, para triagem da doença de Chagas em 10.000 amostras de sangue de banco de sangue, em que a prevalência da doença de Chagas é de 0,5%.

Teste	Doença   Diagnóstico verdadeiro		Total
	Presente	Ausente	
Reagente	49	199	248
Não reagente	1	9.751	9.752
Total	50	9.950	10.000



## Reprodutibilidade

Refere-se à obtenção de resultados iguais em testes realizados com a mesma amostra do material biológico, quando feitos por diferentes pessoas em locais distintos e se garante quando a precisão e a exatidão são sempre avaliadas. A variação da reprodutibilidade está associada a fatores relacionados com erros acidentais ou sistemáticos que podem ser evitados quando se trabalha com profissionalismo, aparelhos bem calibrados, reagentes confiáveis e ambiente saudável. A introdução de um soro de referência perfeitamente definido e de boa procedência, como rotina diagnóstica, ajuda a detectar a ocorrência de erros sistemáticos ou acidentais. Muitas vezes, erros humanos podem ser a causa da não reprodutibilidade dos resultados, principalmente quando o laboratorista inventa sua própria metodologia de trabalho, sem atender às especificações dos fabricantes mencionadas nas bulas dos produtos.

A reprodutibilidade pode ser avaliada intrateste ou interteste. Reprodutibilidade intrateste refere-se à repetição do teste ao mesmo tempo, por ensaios em replicata do mesmo material. Reprodutibilidade interteste refere-se à repetição da mesma amostra em testes realizados em dias diferentes e em laboratórios distintos. A variação da reprodutibilidade pode ser medida pelo desvio padrão (DP), expresso pela fórmula:

$$DP = \sqrt{(X - \bar{X})^2 / N - 1}$$

que pode ser também expresso como coeficiente de variação (CV):

$$CV = \frac{DP \times 100}{X}$$

A reprodutibilidade também pode ser medida pelo grau de concordância entre os resultados de dois ou mais observadores, calculando-se o índice kappa, a partir do Quadro 1.5. O índice kappa leva em consideração as proporções das concordâncias esperadas (Pe) e das observadas (Po). O valor de kappa varia de negativo a 1. O Quadro 1.6 apresenta a classificação do índice kappa.

Po = a + d/N (essa proporção não leva em conta os resultados concordantes que ocorrem em função da chance).

$$Pe = \frac{[(a + b)(a + c)] + (c + d)(b + d)}{N^2}$$

$$\text{Índice kappa } (\kappa) = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

## ► Aplicação de testes diagnósticos

### ▪ Escolha de um limiar de reatividade ou cut-off

Entende-se como limiar de reatividade ou *cut-off* a região de corte de um teste diagnóstico, ou seja, um valor acima

**Quadro 1.6 - Classificação do índice kappa, segundo Fleiss (1985).**

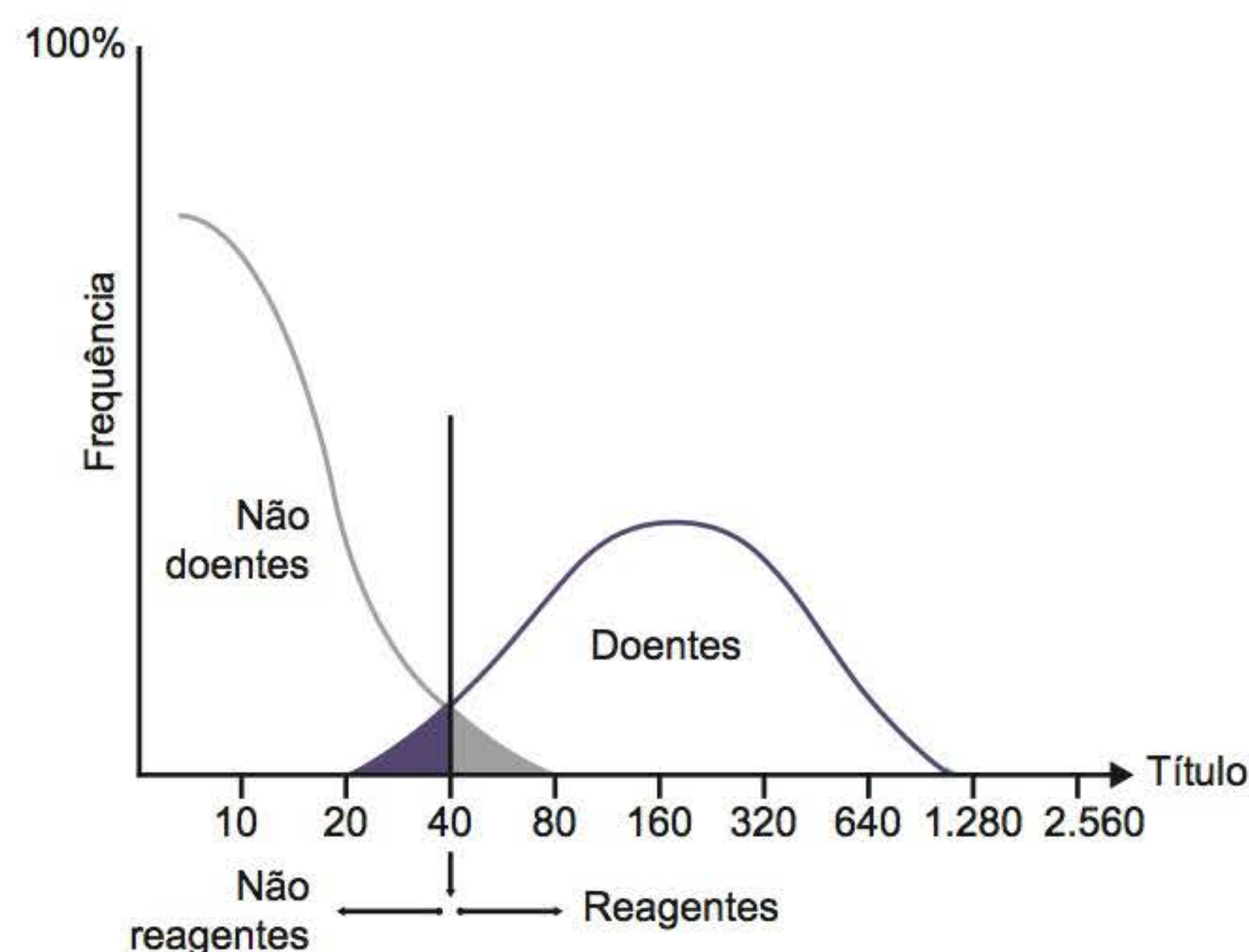
Valor de kappa	Concordância
0	—
0,00 a 0,20	Ruim
0,21 a 0,40	Fraca
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1,00	Quase perfeita

do qual os resultados são considerados positivos e indicam os doentes, e abaixo os resultados são dados como negativos e correspondem aos não doentes. Para exemplificar, será analisada uma curva de distribuição de frequência de títulos de anticorpos normalmente observada na população-alvo (Figura 1.1).

Analisando a curva A, de indivíduos não doentes, observa-se alta frequência de soros reagentes com baixos títulos que progressivamente vão se negativando. Imbricada a essa curva, tem-se a curva B de indivíduos doentes, que apresenta uma frequência menor de soros reagentes com títulos elevados.

A reatividade observada na curva A ocorre por reações inespecíficas de anticorpos a diferentes estímulos antigênicos, principalmente relacionados com epitopos comuns encontrados em inúmeros microrganismos parasitos da microflora normal, ou em indivíduos poliparasitados.

Quanto menor for a frequência no ponto de encontro das curvas, maior será a discriminação entre os resultados sorológicos na população estudada. No teste ideal não existiria o ponto de encontro das curvas e facilmente seriam discriminados os indivíduos doentes dos não doentes.



**Figura 1.1** Curva de distribuição da frequência de títulos de anticorpos normalmente observada na população.

**Quadro 1.5 - Cálculo do índice kappa.**

		Observador 2		
		Positivo	Negativo	Total
Observador 1	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	N



Assim, para determinação do limiar de reatividade, deve-se saber a que se destina o teste. Se for para uso em banco de sangue, é necessário um teste com máxima sensibilidade. Assim, a região de corte seria deslocada para a esquerda, isto é, o *cut-off* seria em menor diluição do soro. Nesse caso, o número de resultados falso-positivos tende a aumentar, o que pode levar a um pânico social se os indivíduos sorologicamente positivos não forem acompanhados clínica e epidemiologicamente. Infelizmente, nem todos os bancos de sangue dispõem desses serviços, e a marginalização de indivíduos sorologicamente positivos, mas com falsos resultados, tem aumentado sistematicamente nos grandes centros urbanos.

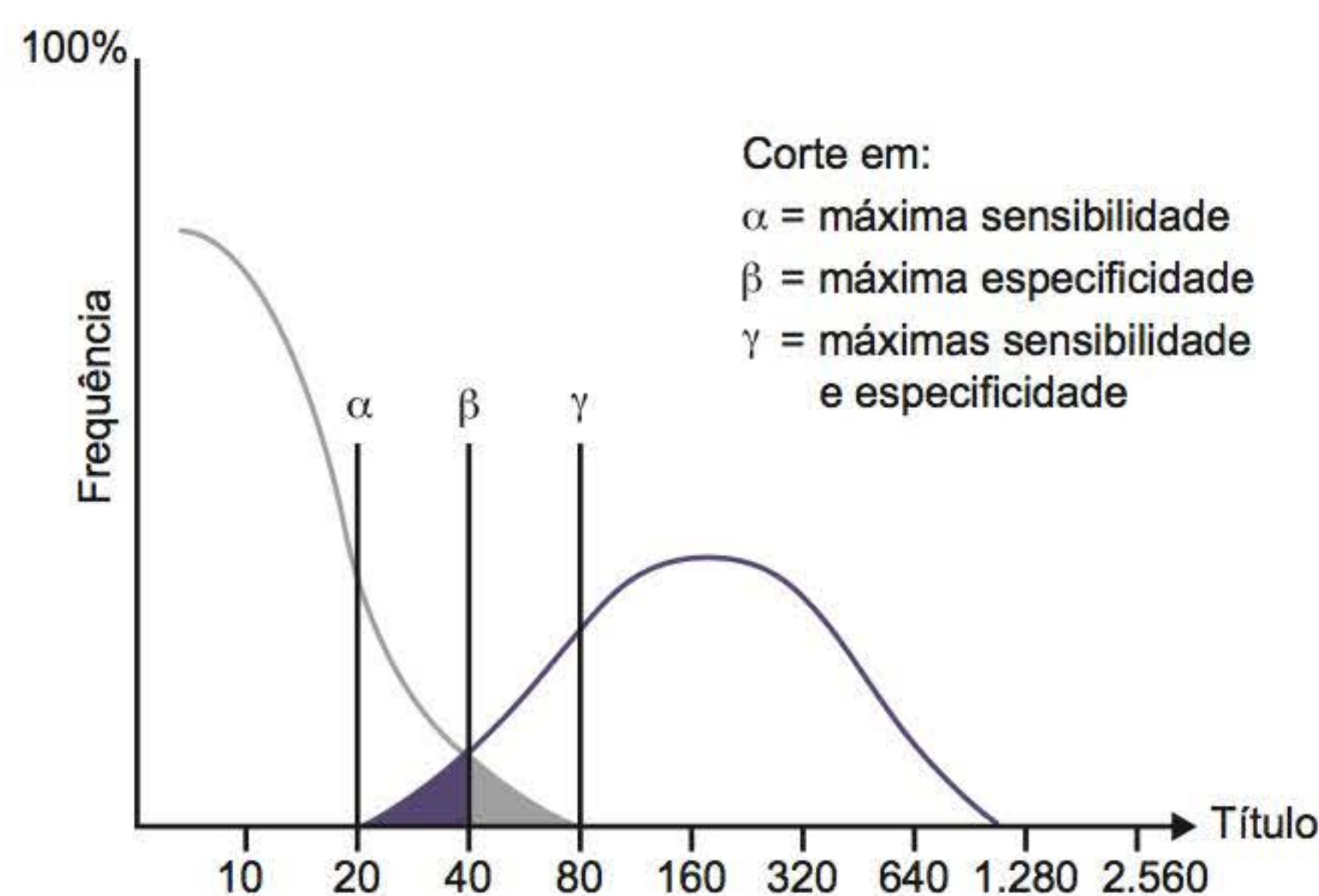
Se o teste for ser usado em laboratório clínico, onde a prevalência teoricamente é muito alta, é necessário um teste com máxima especificidade. Desse modo, a região de corte é deslocada para a direita, isto é, o *cut-off* seria em maior diluição do soro. O aumento do número de resultados falso-negativos é compensado pela verdadeira história clínica do paciente.

Em inquéritos epidemiológicos, é necessário um teste com alta sensibilidade, considerando a baixa prevalência da doença na população.

Se o teste for ser usado para avaliar o efeito de uma vacina, o parâmetro mais importante é a especificidade do teste, considerando o risco de a doença ocorrer nos indivíduos vacinados. Um teste com baixa especificidade irá fornecer muitos resultados falso-positivos que vão caracterizar a vacina como não eficaz.

A Figura 1.2 exemplifica a variação do limiar de reatividade como anteriormente referido. A sensibilidade e a especificidade de um teste são inversamente correlacionadas.

A determinação do limiar de reatividade é feita a partir da média dos resultados obtidos com amostras de indivíduos não doentes mais  $n$  vezes o desvio padrão ( $n$  pode ser 1, 2, 3 etc.), até que o valor obtido em densidade óptica seja igual ao basal da população de indivíduos não infectados. Nos testes imunoenzimáticos ocorrem com muita frequência variações de densidades ópticas entre diferentes placas. Para minimizar esse efeito, pode-se utilizar um soro limiar de reatividade (SLR) para uniformizar os resultados obtidos. O SLR é preparado a partir de *pool* de soros reagentes diluído em *pool* de soros não reagentes até a obtenção de densidade óptica igual à basal da população não infectada. Os resultados são fornecidos em

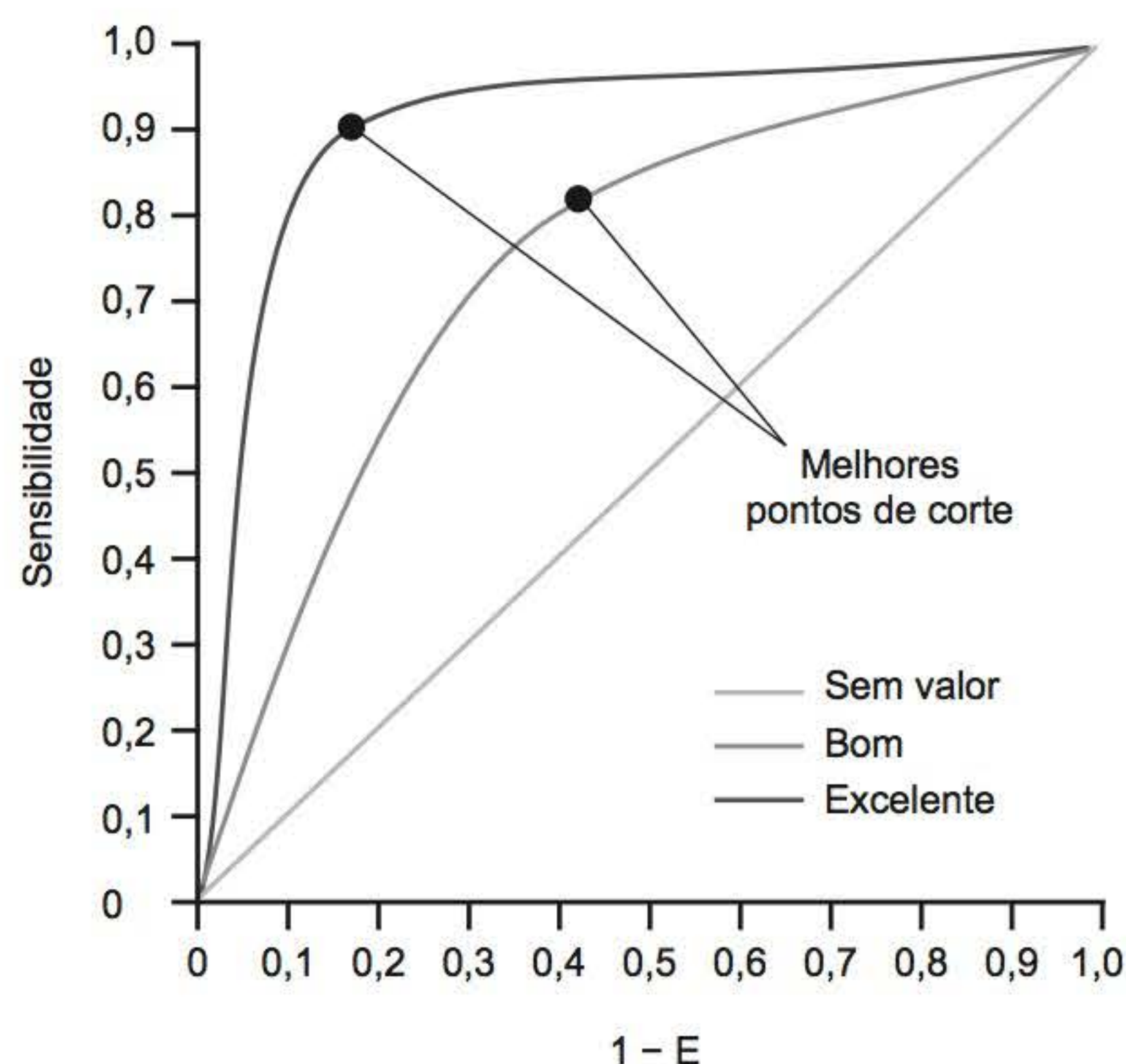


**Figura 1.2** Curva de distribuição da frequência de títulos de anticorpos, que mostra regiões de corte para obtenção de máxima sensibilidade e/ou máxima especificidade.

índice de reatividade que se obtém dividindo-se a densidade óptica da amostra teste pela densidade óptica do SLR.

## ▪ Curva receiver operating characteristics

Quando um teste diagnóstico produz medida contínua, é conveniente selecionar um *cut-off* diagnóstico para calcular a sensibilidade e a especificidade. Para cada *cut-off* estabelecido, há uma sensibilidade e uma especificidade correspondente. Um gráfico com a sensibilidade no eixo do y e a taxa de falso-positivos ( $1 - \text{especificidade}$ ) no eixo do x para todos valores de *cut-off* possíveis do teste diagnóstico mostrará a curva resultante conhecida como *receiver operating characteristic curve* (ROC), ilustrada na Figura 1.3. Esta curva representa o desempenho de um teste; um teste perfeito seria aquele sem falso-positivos ou falso-negativos e seria representado por uma linha que se iniciasse na origem e subisse verticalmente até 1 no eixo y, isto significaria zero de falso-negativos. Um teste que tenha falso-positivos na mesma proporção de verdadeiro-positivos apresentaria uma linha na diagonal. Se dois ou mais testes estão disponíveis para o mesmo problema clínico pode-se comparar as curvas ROC. Quanto maior a área embaixo da curva, melhor o teste.



**Figura 1.3** Exemplo de uma curva ROC (*receiver operating characteristics*). Eixo y: probabilidade de resultados positivos na ocorrência de doença; eixo x: probabilidade de teste positivo na ausência de doença. O ponto mais à esquerda e mais acima corresponde ao melhor ponto de corte para o teste em questão: maior sensibilidade com menor número de falso-positivos ( $1 - E$ ), tornando o diagnóstico mais acurado.

## ► Bibliografia

- Fleiss AR. Clinical epidemiology. In: The Architecture of Clinical Research. Philadelphia: Saunders 1985; p. 185-186.
- Galen RS, Gambino SR. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York: John Wiley, 1975.
- Gambino R. The misuse of predictive value – or why you must consider the ODDS. Ann 1st Super Sanita 1991; 27(3): 395-400.
- Griner PF, Mayewshi RJ, Mushlin AI *et al.* Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Ann Int Med 1981, 94:553-600.
- Sox Jr. H. Probability theory in the use of diagnostic tests. An introduction to critical study of the literature. Ann Int Med 1986, 104:60-66.



## Capítulo 2

---

# Testes Sorológicos

*Maria Carmen Arroyo Sanchez*

- Introdução, 13
- Precipitação, 13
- Aglutinação, 18
- Ensaio lítico, 20
- Teste de imunofluorescência, 21
- Técnicas com marcadores radioativos, 24
- Técnicas imunoenzimáticas, 27
- Ensaio quimioluminescente, 36
- Microscopia imunoeletrônica, 37
- Ensaio imunocromatográfico, 39
- Técnicas empregadas na automação, 41
- Bibliografia, 48



## ► Introdução

Os testes sorológicos ou imunoensaios são técnicas para detectar e quantificar antígenos e anticorpos, ou outras substâncias que desempenhem o papel de antígeno no ensaio, tais como fármacos, hormônios, ácidos nucleicos, citocinas, receptores de células etc. Podem utilizar reagentes marcados ou não marcados. Os ensaios clássicos com reagentes não marcados, como os que se baseiam no princípio da precipitação, têm sensibilidade de detecção menor, pois é necessária a formação de grandes complexos antígeno-anticorpo para que sejam detectados. Por outro lado, sistemas automatizados que utilizam o princípio da precipitação, como a nefelometria e a turbidimetria, apresentam sensibilidade bem maior. Nos ensaios com reagentes marcados, estes amplificam o sinal, aumentando a sensibilidade de detecção. Os marcadores comumente utilizados são os radioativos, enzimáticos, fluorescentes e quimioluminescentes. A amplificação do sinal também pode ser obtida com o emprego de partículas, como na aglutinação e nos métodos automatizados de precipitação, que são híbridos entre os métodos com reagentes marcados e não marcados.

Nas últimas décadas, houve grande desenvolvimento nos testes para imunodiagnóstico em relação aos anticorpos e antígenos empregados e também em relação aos métodos. O advento dos anticorpos monoclonais proporcionou um grande avanço porque possibilitou a produção, em grandes quantidades, de anticorpos homogêneos e totalmente caracterizáveis. Esses anticorpos, altamente específicos, são a base de vários testes de pesquisa de antígenos, hormônios, fármacos etc. Por outro lado, a análise da estrutura dos principais componentes antigênicos dos microrganismos levou à identificação dos antígenos mais importantes na detecção de anticorpos. Tais antígenos podem ser preparados, em larga escala, por síntese peptídica e tecnologia recombinante, o que aumenta a especificidade dos testes para a pesquisa de anticorpos. Com relação aos métodos, tem sido observada uma tendência ao aperfeiçoamento e à consolidação dos testes já existentes, e, ao mesmo tempo, ao emprego de tecnologias emergentes. Essas estratégias objetivam aumentar o nível de sensibilidade e de confiabilidade dos resultados obtidos e tornar os testes mais rápidos, de mais simples execução e adaptáveis a processos automatizados ou a ensaios *point-of-care* para aplicação em consultórios, clínicas, domicílios, áreas remotas etc. Um importante avanço tem sido o desenvolvimento de métodos multiparamétricos (que possibilitam a detecção de substâncias diferentes, simultaneamente, em um mesmo ensaio) para a pesquisa de anticorpos, antígenos, hormônios, medicamentos etc., que possam ser implementados na rotina laboratorial.

Os testes sorológicos têm se tornado cada vez mais refinados e de execução simples, porém, para garantir a qualidade dos resultados é necessário manter um controle bem rigoroso. As técnicas devem ser cuidadosamente padronizadas, observando aspectos como a concentração do antígeno, a especificidade dos anticorpos, o título dos conjugados, o tempo, a temperatura e os diluentes. A fim de eliminar erros sistemáticos, é aconselhável manter um programa de controle de qualidade permanente para avaliar equipamentos, reagentes e outros fatores. Os testes devem ser monitorados sistematicamente, empregando-se amostras de painel de soros rigorosamente padronizados. Os protocolos dos testes devem ser seguidos à risca e as medidas devem ser feitas com exatidão, evitando-se erros esporádicos. As condições de realização do teste e de leitura dos resultados devem ser padronizadas em cada laboratório.

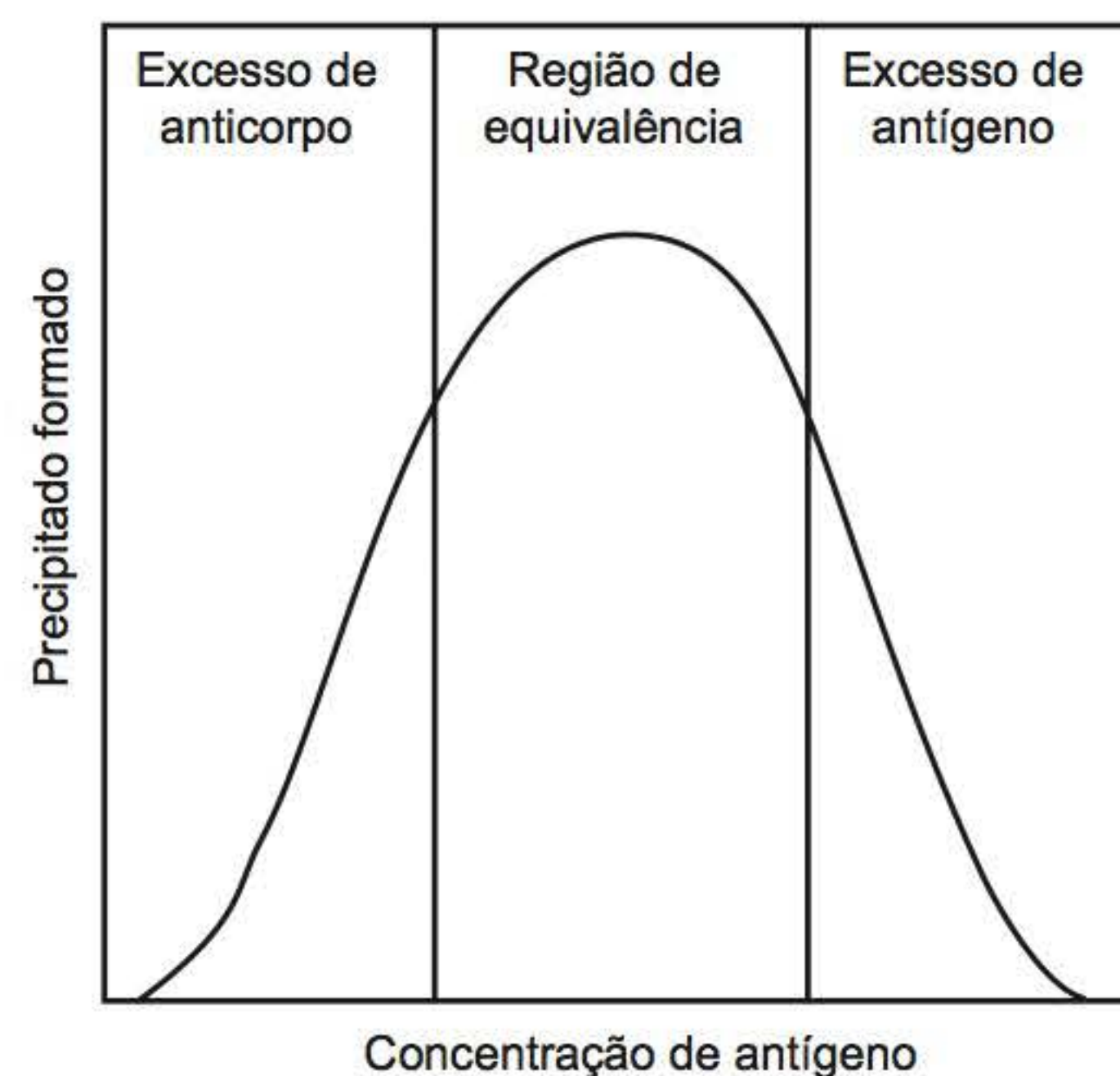
As metas para o laboratório clínico devem ser melhorar a disponibilidade, a exatidão e a precisão dos testes de interesse clínico, garantir a correta interpretação dos resultados, facilitar a transmissão de dados e avaliar a importância de novos testes introduzidos. Nesse sentido, maior conhecimento dos métodos e princípios utilizados na pesquisa de antígenos e anticorpos pode auxiliar na aplicação e interpretação da grande variedade de técnicas disponíveis.

Neste capítulo são descritas técnicas para a pesquisa de antígenos, anticorpos e outras substâncias que desempenham o papel de antígenos nos ensaios e são importantes no laboratório clínico, como suporte e complementação ao diagnóstico, desde que utilizadas em condições ótimas de padronização e controle de qualidade e ressaltadas suas indicações e limitações. É importante salientar que este capítulo não tem a pretensão de ser um manual de técnicas, mas sim uma revisão de métodos, com seus princípios fundamentais e aplicações principais, para a pesquisa de antígenos e anticorpos.

## ► Precipitação

As técnicas de precipitação, fundamentadas na quantificação de precipitados produzidos pela reação antígeno-anticorpo, começaram há mais de 100 anos. Em 1897, Rudolf Kraus, em Viena, relatou a precipitação que ocorria devido à interação de antígenos solúveis e seus antissoros correspondentes e, em 1905, Bechhold, na Alemanha, apresentou seus experimentos sobre precipitados em géis.

A quantidade de precipitado formado quando se adiciona antígeno a uma concentração constante de anticorpo é caracterizada por uma curva parabólica, descrita por Heidelberger e Kendall em 1935. Essa quantidade de precipitado depende de vários fatores físico-químicos e imunológicos, mas principalmente das concentrações relativas do antígeno e do anticorpo. Quando as quantidades de antígeno e de anticorpo são equivalentes (região de equivalência), a precipitação é máxima, e decresce quando há excesso de antígeno ou anticorpo (Figura 2.1). Precipitados já formados podem se dissolver quando expostos a excesso de um dos reagentes, devido à reversibilidade da ligação antígeno-anticorpo. O fenômeno de prozona ocorre quando há excesso de anticorpo e pode cau-



**Figura 2.1** Curva de precipitação representando a quantidade de precipitado formado na reação antígeno-anticorpo com concentrações crescentes de antígeno e quantidade fixa de anticorpo.



sar erros na interpretação dos resultados, tornando necessário realizar a titulação do anticorpo com quantidades fixas de antígeno para evitar tais erros. Podem precipitar na presença de anticorpos específicos, além de proteínas, carboidratos e complexos glicolipídicos.

## ▪ Imunodifusão

A difusão de uma substância solúvel em um meio fluido é um processo pelo qual a substância é transportada, de uma parte para outra, como resultado do movimento molecular ao acaso. A difusão pode ser efetuada em um meio gelificado, que impede a formação de correntes por diferenças de temperatura. Se os poros do gel forem consideravelmente maiores do que as partículas, a difusão ocorrerá como em um meio fluido. Quando os imunoprecipitados são formados no gel de ágar ou agarose, o tamanho dos agregados fica maior do que o diâmetro dos poros e evita-se a difusão dos complexos antígeno-anticorpo. As técnicas de imunodifusão detectam a reação antígeno-anticorpo por meio da formação de um precipitado.

A imunodifusão pode ser simples ou dupla. Na imunodifusão simples, o antígeno ou o anticorpo permanecem fixados ao suporte e o outro se difunde até que ocorra a precipitação do complexo. Na imunodifusão dupla, tanto o antígeno quanto o anticorpo se movem, um em direção ao outro, até haver a precipitação. Em ambos os casos, a difusão pode ser linear (unidimensional) ou radial (bidimensional).

### Imunodifusão simples em uma dimensão

O método de Oudin (1946) baseia-se na difusão simples em uma dimensão e permite a análise qualitativa e quantitativa dos sistemas de precipitação. Nessa técnica, o antissoro é incorporado ao ágar e essa mistura é colocada em um tubo até formar uma coluna de 35 a 45 mm de altura. Após a gelificação, o antígeno é colocado no topo da coluna. Os tubos são selados, para evitar evaporação, e deixados a uma temperatura constante durante o período de observação, que é, em geral, de 1 semana. A fim de induzir a difusão do reagente externo no gel, sua concentração deve ser bem maior do que a do reagente contido no gel.

### Dupla imunodifusão de Ouchterlony

O método de dupla difusão em gel de ágar foi descrito em 1947 por Ouchterlony, na Suécia, e se baseia na precipitação que ocorre na região de equivalência, perpendicular à linha do eixo entre os orifícios, quando o antígeno e o anticorpo se difundem no ágar. O complexo antígeno-anticorpo apresenta-se sob a forma de linha ou arco de precipitação. A velocidade de difusão de cada substância é regida pelas leis da difusão e depende da concentração e do tamanho da molécula, do tamanho dos poros do gel, da temperatura, da concentração do ágar e de sua pureza.

O teste é realizado colocando-se uma camada de ágar em lâminas de vidro ou placas de Petri previamente recobertas por uma fina camada de ágar. Após a gelificação são feitos orifícios no ágar, de acordo com o sistema a ser analisado. As soluções que contêm o antígeno e o anticorpo são colocadas nos orifícios do ágar, e as placas ou lâminas são incubadas em câmara úmida com vedação por 18 a 48 h a 37°C, ou por 2 a 3 dias à temperatura ambiente.

Cada linha em um espectro de precipitação corresponde a um par antígeno-anticorpo. Cada precipitado funciona como uma barreira para os reagentes que o formam e impede sua difusão além do sítio de precipitação. Essa barreira é imuno-específica e a difusão de outros reagentes não é impedida, a menos que a densidade dos agregados provoque um obstáculo mecânico.

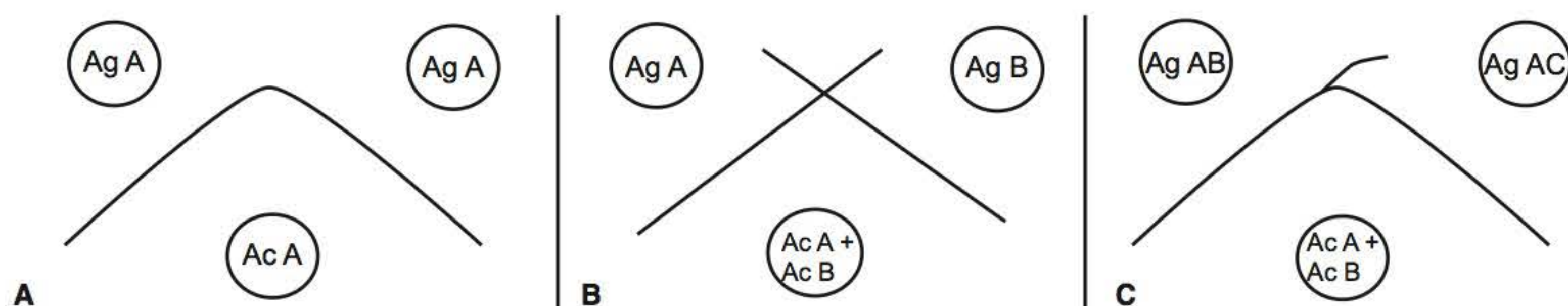
O método de Ouchterlony permite a comparação de vários sistemas antigênicos, desde que colocados em orifícios adjacentes, contra um mesmo sistema de anticorpos, formando vários padrões que indicam a existência, ou não, de determinantes antigênicos comuns. As linhas formadas podem ser completamente coalescentes se os anticorpos forem específicos para os mesmos determinantes antigênicos em cada preparação (identidade imunológica); podem apresentar um “esporão”, como no caso de antígenos com alguns determinantes em comum, parcialmente relacionados (identidade parcial); ou podem formar uma interseção, indicando a ausência de determinantes antigênicos em comum (não identidade) (Figura 2.2). Quando os reagentes estão em quantidades balanceadas, a linha de precipitação formada terá curvatura voltada para o orifício que contém a substância de maior peso molecular e se difunde mais lentamente.

O método pode ser utilizado para avaliações semiquantitativas, quando se conhece a especificidade das linhas de precipitação, como, por exemplo, na titulação de antígenos ou de anticorpos. Podem-se caracterizar antígenos de vários agentes infecciosos empregando-se anticorpos de especificidade e reatividade conhecidas. A formação de uma única linha de precipitação dá indícios da pureza do antígeno ou do anticorpo, porém não com muita precisão.

O método apresenta várias limitações, pois requer 18 a 24 h de difusão para que a reação se processe, não sendo útil em casos em que se necessita de um método rápido de diagnóstico. Ao mesmo tempo, apresenta sensibilidade baixa e limita-se à detecção de reações antígeno-anticorpo em que há a formação de precipitados.

### Imunodifusão radial simples

Foram desenvolvidos dois métodos principais de imunodifusão radial simples para realizar a determinação quantitativa de antígenos, o de Mancini e o de Fahey, ambos em 1965. A diferença entre essas técnicas está no tempo de difusão.



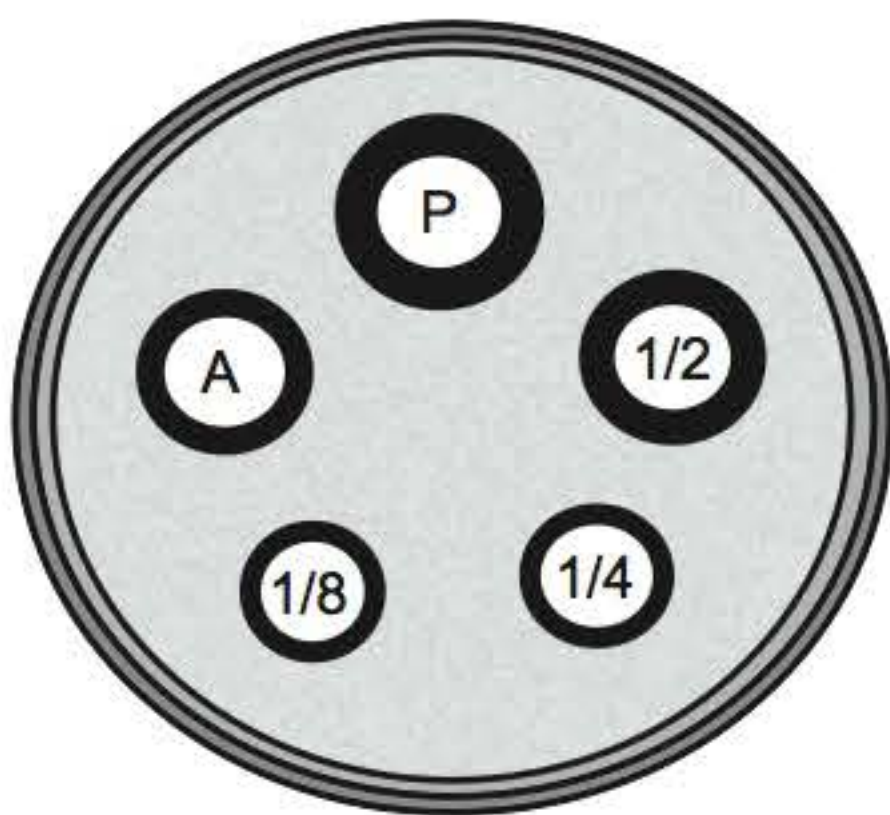
**Figura 2.2** Padrões da reação de dupla imunodifusão de Ouchterlony em gel de ágar. **A.** Reação de identidade – indica a presença de determinantes antigênicos idênticos. **B.** Reação de não identidade – indica a presença de determinantes antigênicos não relacionados. **C.** Reação de identidade parcial – indica a presença de determinantes antigênicos parcialmente relacionados.



Em ambos os métodos, o ágar é misturado com a diluição apropriada do anticorpo específico para determinado antígeno e a mistura é colocada em placa de Petri ou lâmina de vidro. Em locais apropriados do gel, são feitos orifícios onde se colocam volumes precisos das soluções de antígeno a serem testadas, bem como soluções padrão, com pelo menos três concentrações conhecidas do antígeno (Figura 2.3). O suporte é incubado em câmara úmida até o término da difusão (48 a 72 h no método de Mancini) ou por 6 a 12 h (no método de Fahey). Se houver quantidade de anticorpo suficiente e na ausência de restrições à difusão livre do antígeno, o diâmetro do halo de precipitação se correlaciona com a concentração do antígeno: enquanto o halo está aumentando, o logaritmo da concentração do antígeno é aproximadamente proporcional ao diâmetro do halo no ponto final, e a área (quadrado do diâmetro) varia diretamente com a concentração. A sensibilidade do teste pode variar de acordo com a concentração do antissoro. Uma concentração baixa de antissoro aumenta a sensibilidade, mas não permite a medida de concentrações de antígeno em excesso. Por outro lado, uma alta concentração de antissoro diminui a sensibilidade, mas permite a quantificação de concentrações maiores de antígeno.

O método de Mancini, que mede o diâmetro do halo após o término da difusão (ponto final), baseia-se no fato de que, após certo tempo, dependendo da concentração e do peso molecular da proteína, o halo de precipitação alcança um valor máximo que não aumenta ainda que o período de incubação seja ampliado. Para uma dada concentração de anticorpo, ao término da difusão, a área do halo formado (quadrado do seu diâmetro) é diretamente proporcional à concentração do antígeno no orifício. Em concentrações normais, o tempo necessário para atingir o diâmetro máximo é de 24 h para IgG e de 50 h para IgM, aproximadamente. Enquanto os halos do padrão e da amostra não atingem seu tamanho máximo, não se estabelece a relação linear entre a área ( $\text{mm}^2$ ) e a concentração. Esse método é preciso, reprodutível e sensível, porém muito demorado.

O método de Fahey é cinético e os halos de precipitação podem ser medidos antes do término da difusão (após 6 a 12 h) e, nesse caso, o logaritmo da concentração do antígeno é proporcional ao diâmetro do halo. Empregando-se antígenos padrão diluídos em série é possível construir curvas padrão, e as equações que descrevem tais curvas podem ser utilizadas para determinar a concentração de antígeno correspondente a qualquer diâmetro.



**Figura 2.3** Esquema da imunodifusão radial de Mancini. O anticorpo está incorporado ao ágar. Diluições em série do antígeno padrão (puro, diluído a 1/2, a 1/4 e a 1/8) são colocadas nos orifícios do ágar, e após um período de difusão ocorre a precipitação, formando-se halos de diâmetro decrescente na região de equivalência. A concentração de antígeno na amostra desconhecida (A) pode ser determinada em função do diâmetro do halo por interpolação na curva padrão.

A sensibilidade desses métodos varia de 1 a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antígeno.

## ■ Técnicas que utilizam a eletroforese

O termo eletroforese foi utilizado pela primeira vez por Michaelis, em 1906, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico. Na eletroforese, ocorre a migração de partículas carregadas em um solvente condutor sob a influência de um campo elétrico. Entre os fatores que governam a migração estão a carga, o tamanho, a forma e o grau de solvatação das partículas, a concentração, a força iônica e o pH do solvente, a temperatura e a viscosidade do meio e o caráter e a intensidade do campo elétrico.

As proteínas são *zwitterions*, apresentam cargas positivas e negativas, e, assim, segundo o seu ponto isoelétrico e variações de pH, podem migrar para o polo positivo se a carga da superfície for negativa, ou para o polo negativo se a carga for positiva. Em um campo elétrico de uma dada intensidade, proteínas diferentes migram com velocidades características, o que permite defini-las em termos de sua mobilidade eletroforética. Essa mobilidade depende diretamente da carga líquida da proteína e inversamente da resistência exercida pelo solvente e pelo suporte. A carga líquida da proteína depende, principalmente, do pH da solução. Se o pH do tampão for inferior ao ponto isoelétrico (pH em que a carga líquida da proteína é zero), a proteína migra como um cátion para o polo negativo, havendo aumento na mobilidade com a diminuição do pH. Por outro lado, se o pH for superior ao ponto isoelétrico, a proteína migra como um ânion para o polo positivo, havendo aumento da mobilidade com o aumento do pH. A carga de uma proteína também é influenciada pelo grau com que outros íons em solução se ligam a ela. A força iônica do tampão influencia a carga efetiva da proteína e, consequentemente, a sua mobilidade. O aumento da força iônica diminui a mobilidade, porém aumenta a resolução das bandas. Por outro lado, forças iônicas mais elevadas provocam aumento na corrente, na temperatura, nos tempos de corrida e na difusão. A escolha da força iônica do tampão é um ponto de grande importância na eletroforese, sendo necessário otimizar as demais condições, de acordo com o equipamento e as necessidades de cada laboratório.

A separação das proteínas em um campo elétrico foi realizada pela primeira vez por Tiselius, em 1937, que utilizou a técnica de eletroforese de fronteira móvel. No mesmo ano, König descreveu a eletroforese de zona ou eletroforese em suporte poroso empregando tiras de papel para separar as proteínas de veneno de cobra. Em 1950, Durrum utilizou a técnica para separar as proteínas séricas, dando início à sua aplicação na Química Clínica. Posteriormente foram introduzidos outros suportes, como gel de amido (1955), acetato de celulose (1957), gel de poliacrilamida (1959) e gel de agarose (1961). Em 1981, Jorgenson e Lukacs descreveram a eletroforese capilar utilizando coluna capilar de vidro e tampão aquoso para separar compostos carregados eletricamente, o que demonstrou o potencial da técnica na separação analítica.

## Eletroforese de zona

Como já mencionado, há dois tipos básicos de suporte para a eletroforese de zona: os de papel (papel de filtro, acetato de celulose) e os de gel (amido, agarose e poliacrilamida).

Na eletroforese de zona, com suportes de papel, devido à natureza hidrofílica da celulose, forma-se uma película de



líquido sobre o papel de modo que a solução sofre pouca influência de fatores mecânicos. Desse modo, as macromoléculas são separadas, quase que exclusivamente, com base na sua carga de superfície; quanto maior a carga, maior a velocidade de migração.

Empregando-se géis como suportes, a separação é realizada de acordo com a carga e também o tamanho e a estrutura das moléculas. Macromoléculas de baixo peso molecular migram livremente de acordo com as respectivas cargas, enquanto as maiores ficam retidas nos poros do gel.

Em relação à técnica propriamente dita, as amostras de soro ou outro fluido biológico devem ser aplicadas como uma banda compacta, em um suporte apropriado para impedir a convecção. São colocadas na origem e separadas pela eletroforese após 60 a 90 min de corrida, empregando-se tampão alcalino. As moléculas carregadas negativamente migram para o ânodo e as carregadas positivamente, para o cátodo. As tiras são coradas para proteínas e escaneadas em um densitômetro, que detecta diferenças de absorção devidas a concentrações diferentes de proteínas e as reproduz, convertendo o padrão de bandas em picos.

As principais aplicações clínicas da eletroforese de zona incluem a análise das proteínas de amostras de soro, urina, liquor e outros fluidos biológicos, análise de isoenzimas, análise de ácidos nucleicos etc. A escolha do meio de suporte depende dos objetivos, mas, de modo geral, para proteínas, géis de poliacrilamida têm sido preferidos graças ao seu maior poder de resolução, variando o tamanho dos poros. Para fragmentos de DNA e RNA, utiliza-se o gel de agarose.

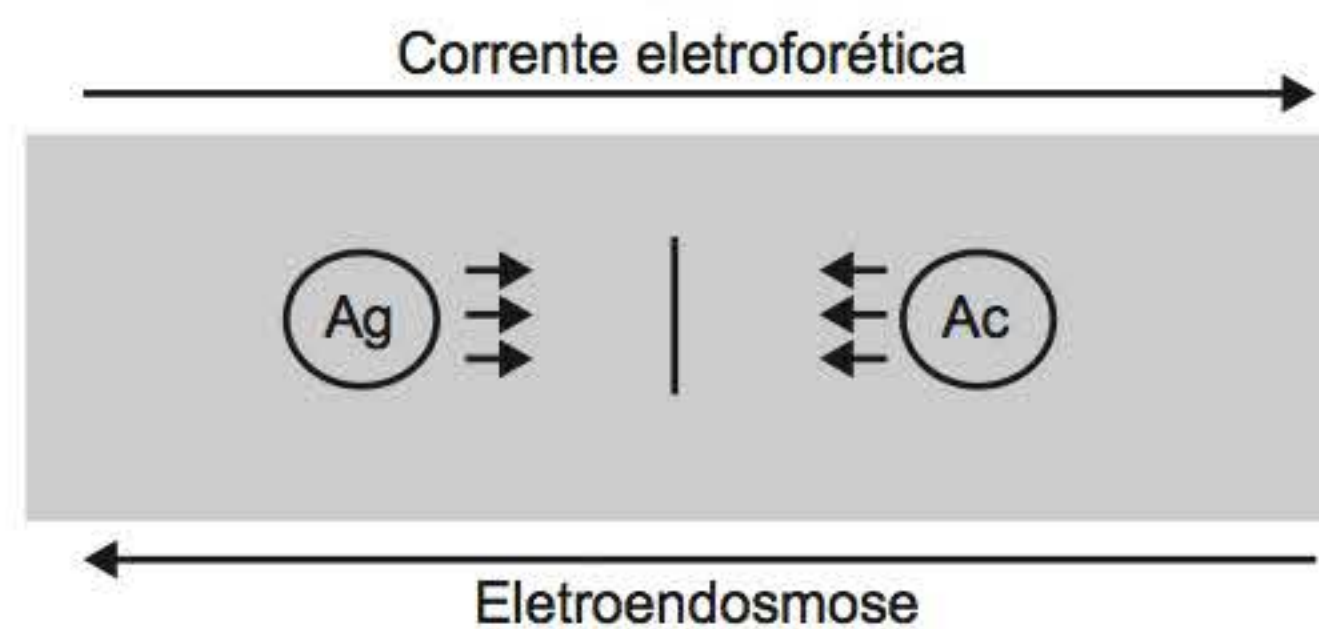
Devido à sua menor sensibilidade em relação a outros métodos, a eletroforese de zona, quase sempre, é um teste de triagem, sendo necessário utilizar testes bioquímicos ou imunológicos para identificar a proteína em estudo. Entre as aplicações mais importantes da eletroforese de zona estão a eletroimunodifusão, a imunoeletroforese, a imunofixação e o *immunoblotting*.

### Eletroimunodifusão

Também chamada de imunoeletrodifusão e eletroimuno-precipitação. Associa a imunodifusão à eletroforese, promovendo aumento da velocidade de precipitação do complexo antígeno-anticorpo no ágar (ou agarose), devido ao direcionamento da migração pelo campo elétrico. Essa técnica tem sido empregada na detecção de antígeno. As variações da técnica com aplicação clínica são a eletroimunodifusão dupla unidimensional e a eletroimunodifusão simples unidimensional.

► **Eletroimunodifusão dupla unidimensional.** Também chamada de imunoeletroforese de contracorrente, contraimunoeletroforese e eletroprecipitação. O princípio básico do método é a eletroforese do antígeno e do anticorpo, simultaneamente, que migram em direções opostas a partir de orifícios separados do gel, resultando na precipitação em um ponto intermediário entre as suas origens (Figura 2.4). O método aproveita a propriedade de arrastamento, pela corrente de eletroendosmose, das moléculas de anticorpo, menos eletronegativas.

Esse método requer que o antígeno e o anticorpo em teste apresentem diferentes mobilidades eletroforéticas. O pH do tampão deve ser escolhido a fim de otimizar os efeitos eletroendosmóticos do anticorpo para o cátodo (polo negativo), enquanto o antígeno se move em direção ao ânodo (polo positivo). O movimento eletroforético e a eletroendosmose concentram rapidamente (30 min) o antígeno e o anticorpo na região entre os poços adjacentes. Essa técnica é semiquantitativa e, aproximadamente, 10 vezes mais sensível do que a



**Figura 2.4** Eletroimunodifusão dupla unidimensional – o antígeno e o anticorpo são colocados nos orifícios do ágar e precipitam pela ação da corrente eletroforética e da eletroendosmose na região de equivalência.

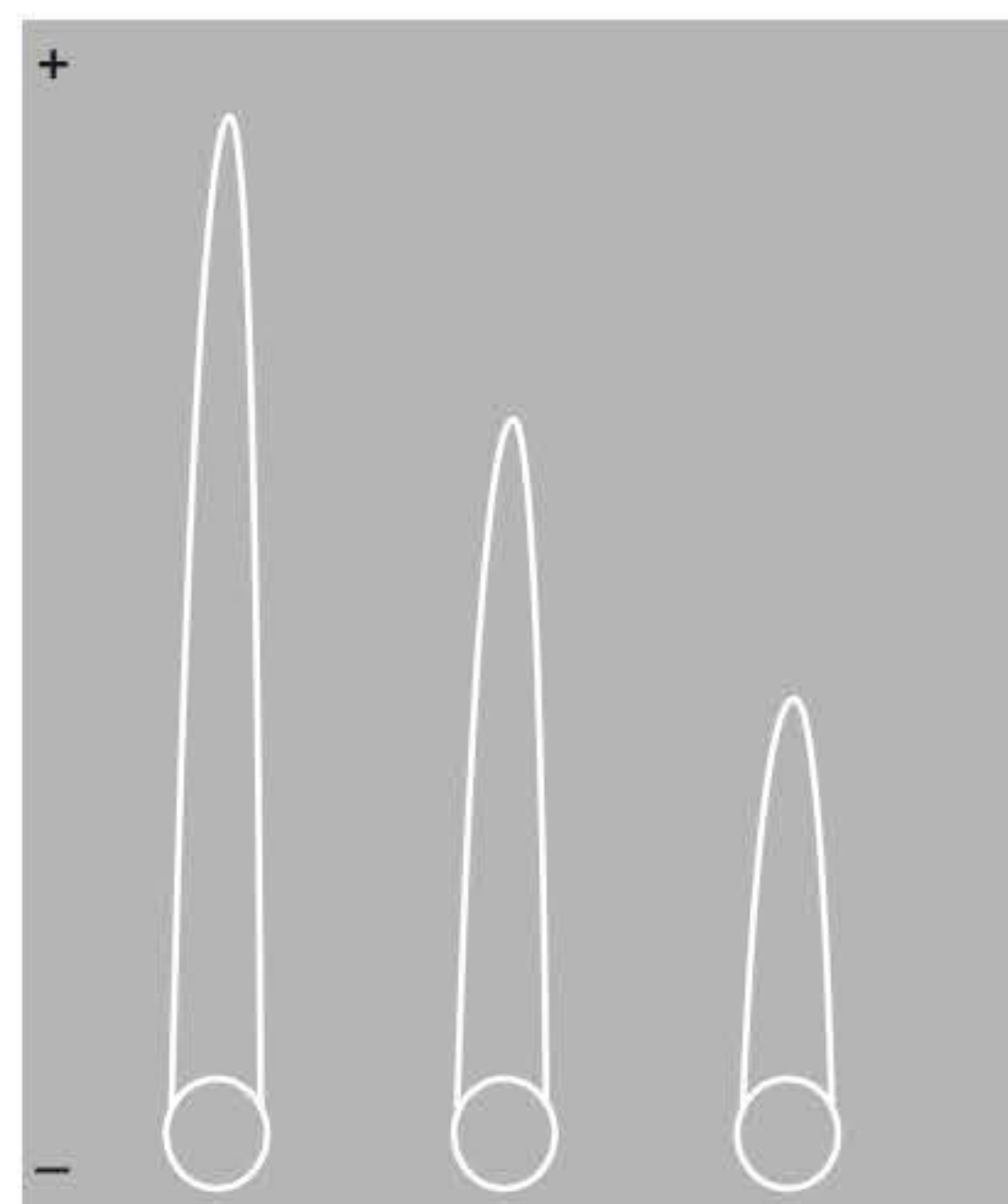
dupla difusão. Dependendo da sensibilidade e especificidade do anticorpo utilizado, as concentrações de antígeno mínimas detectáveis giram em torno de 0,1 µg/ml.

Foi o método originalmente empregado para detectar o antígeno de superfície associado à hepatite B e seu anticorpo. Também tem sido utilizado para a pesquisa de anticorpos contra *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*.

Esse método apresenta as vantagens de concentrar o antígeno e o anticorpo em um único ponto do gel, permitir a realização de várias análises em uma única lâmina, fornecer resultados rápidos e ser mais sensível do que a imunodifusão convencional. Além do gel de ágar, outros suportes podem ser empregados, como o acetato de celulose.

Alternativamente à coloração proteica, pode-se empregar, por exemplo, um conjugado enzimático de anti-imunoglobulina marcada pela peroxidase, que dá origem a um precipitado colorido após a revelação com o substrato apropriado.

► **Eletroimunodifusão simples unidimensional.** Esse método também é conhecido como eletroforese em foguete e técnica de Laurell. Nesta técnica, o antissoro específico para o antígeno ou antígenos que se quer quantificar é incorporado ao gel de agarose, que é colocado em lâmina de vidro. O pH do gel é escolhido de modo que o antígeno fique com carga negativa e os anticorpos não migrem. O material que contém o antígeno é colocado em um pequeno orifício e é submetido à eletroforese. O padrão de precipitação resultante (Figura 2.5) se assemelha a um foguete (eletroforese em foguete). Esse



**Figura 2.5** Eletroimunodifusão simples unidimensional. O ágar contém o antissoro e nas cavidades há concentrações decrescentes de antígeno. Após a eletroforese ocorre a precipitação em forma de "foguete", cuja distância de migração é proporcional à concentração do antígeno.



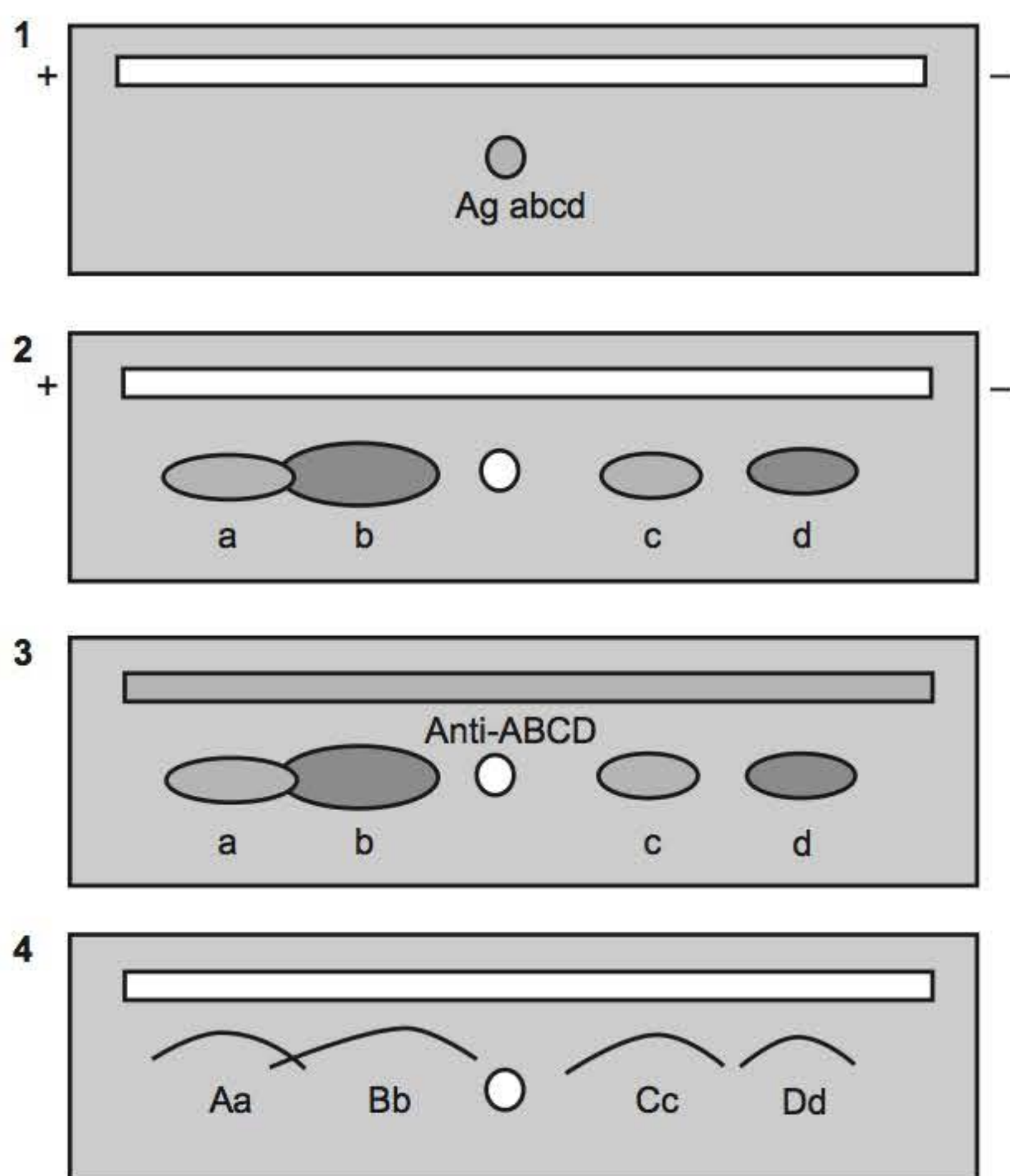
padrão ocorre porque a precipitação se forma nas margens laterais dos limites do antígeno em movimento no ágar que contém o anticorpo. Conforme o antígeno vai precipitando, sua concentração diminui e as margens laterais convergem para uma ponta. Para uma dada concentração de antissoro, a distância total de migração do antígeno, é linearmente proporcional à concentração do antígeno.

A sensibilidade dessa técnica para proteínas é de  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Devido à sua pequena carga negativa, as imunoglobulinas apresentam pequena mobilidade eletroforética nesse sistema, a menos que se utilizem eletrólitos e ágar especial.

### Imunoeletroforese

Descrita pela primeira vez em 1953 por Grabar e Williams, a imunoeletroforese combina dois métodos, a eletroforese em gel, seguida da imunodifusão e precipitação das proteínas. Permite a identificação e caracterização de proteínas que não seriam possíveis com a eletroforese ou a imunodifusão separadamente.

No método original, a imunoeletroforese é realizada em gel de ágar em duas etapas: separação dos componentes por eletroforese; imunodifusão de cada componente a partir do seu centro de difusão, contra o antissoro específico, formando uma linha ou arco de precipitação na região de equivalência. Assim, a caracterização de uma substância é feita a partir de suas propriedades eletroforéticas (mobilidades diferentes devido às diferentes cargas elétricas), coeficientes de difusão (velocidades diferentes de difusão do antígeno devido à sua concentração e ao tamanho da molécula) e propriedades imunológicas (especificidade). O sistema de imunodifusão obtido se aproxima de uma dupla difusão bidimensional e, portanto, os padrões de precipitação que se obtêm podem ser interpretados como nas técnicas de dupla difusão.



**Figura 2.6** Representação esquemática da imunoeletroforese. **1.** A mistura de antígenos (abcd) é colocada no orifício do ágar. **2.** A eletroforese separa os antígenos da mistura. **3.** Coloca-se o antissoro (ABCD) na canaleta. **4.** Após um período de difusão, ocorre a precipitação e são formados arcos correspondentes aos diferentes sistemas antígeno-anticorpo nas respectivas regiões de equivalência.

Nessa técnica, esquematizada na Figura 2.6, recobre-se uma lâmina de vidro com ágar ou agarose em tampão alcalino e, após a solidificação, faz-se um orifício transversal e uma canaleta, longitudinalmente à lâmina. A amostra com o antígeno é colocada no orifício e é separada em um campo elétrico por 30 a 60 min. Coloca-se, então, o antissoro na canaleta e incuba-se a lâmina em câmara úmida a uma temperatura constante, por 18 a 24 h, para que se processe a difusão. As frações separadas pela eletroforese funcionam como antígenos e interagem com seus respectivos anticorpos. No ponto de equivalência de cada sistema antígeno-anticorpo formam-se linhas ou bandas de precipitação que podem ser lavadas, secas e coradas para registro permanente. O anticorpo se difunde paralelamente à canaleta e os antígenos, quando homogêneos, se difundem em círculos, por isso a linha de precipitação se assemelha a um arco de um círculo. Se o antígeno for heterogêneo, a linha de precipitação apresenta forma elíptica.

Nas condições dessa técnica, as gamaglobulinas praticamente permanecem no ponto de aplicação quando se utiliza gel de agarose, ou se deslocam para o polo negativo (sentido oposto ao do movimento na eletroforese) quando se utiliza gel de ágar, que não é neutro e tem eletronegatividade em relação ao tampão de pH básico. Quando se emprega o gel de ágar ocorre o fenômeno conhecido por eletroendosmose, em que há o movimento real de moléculas de água para o polo negativo a fim de compensar as cargas do gel que são atraídas para o polo positivo. As substâncias dissolvidas na água (como as proteínas) acompanham esse movimento, e, quando a mobilidade eletroforética é menor do que a velocidade da eletroforese, o movimento resultante é a migração para o polo negativo. O movimento relativo das substâncias da mistura não se altera devido a esse fenômeno. O fluxo da endosmose é uma função da diferença entre a constante dielétrica do suporte inerte (ágar ou celulose) e a do líquido, e varia com o pH e a força iônica. O efeito da eletroendosmose pode ser diminuído empregando-se ágar de maior pureza (com menor negatividade), reduzindo-se a temperatura do sistema eletroforético ou diminuindo-se a condutividade do tampão. Para evitar a eletroendosmose deve-se empregar agarose no lugar de ágar, pois os géis de agarose não têm grupos polares.

A imunoeletroforese é um método qualitativo aplicável a qualquer substância solúvel imunogênica cujos anticorpos sejam precipitantes. Pode ser aplicada para diagnosticar paraproteinemias, associando-se os seus resultados aos obtidos na eletroforese; para distinguir aumentos policlonais de aumentos monoclonais de gamaglobulinas; para detectar a ausência ou a diminuição de imunoglobulinas que ocorrem em imunodeficiências; para identificar cadeias leves na urina de pacientes com discrasias ou doenças autoimunes; para detectar a natureza monoclonal da proteína de Bence Jones no mieloma; para identificar aumentos na quantidade de proteínas no liquor em doenças neurológicas; para realizar a triagem de imunocomplexos circulantes; e para caracterizar crioglobulinemia e piroglobulinemia.

### Imunofixação

A imunofixação combina dois métodos, a separação das proteínas por eletroforese em gel e, em seguida, a precipitação *in situ* com antissoro monoespecífico. Foi descrita em 1964, porém foi introduzida no estudo das imunoglobulinas em 1976.

A amostra a ser analisada é aplicada várias vezes, dependendo do número de proteínas que se quer identificar, sendo submetida à eletroforese em gel de agarose. A seguir, aplicam-se fitas de papel ou de acetato de celulose impregnadas



com os antissoros. Os antissoros se difundem no gel de agarose e, se os antígenos estiverem presentes em proporções adequadas, ocorre a precipitação dos complexos antígeno-anticorpo, que fixam as proteínas ao gel. Após um período de incubação de 1 a 2 h, remove-se a fita, as proteínas não precipitadas são removidas por lavagem e as bandas são reveladas com corante específico para proteínas.

Comparada à imunofixação, a imunoeletroforese é mais simples e menos sujeita ao fenômeno de excesso de antígeno, porém a imunofixação pode ser otimizada para obter maior sensibilidade e resolução e é de mais fácil interpretação, pois se baseia no exame de um padrão de precipitação análogo ao da eletroforese. É importante salientar que em ambas as técnicas a sensibilidade e especificidade do antissoro empregado são fundamentais para a qualidade dos resultados obtidos.

Há várias modificações da técnica básica, sendo exemplo a utilização de anticorpos marcados com radioisótopos ou enzimas, que aumentam a sensibilidade.

Essa técnica pode ser utilizada em amostras de soro, urina, liquor ou outros fluidos biológicos, principalmente na caracterização de proteínas anômalas, de difícil caracterização na imunoeletroforese, como ocorre nas gamopatias monoclonais, ou doença das cadeias leves, em que aparecem pequenas bandas. Também tem sido empregada na identificação de paraproteínas e de componentes do complemento, sendo frequentemente utilizada como alternativa à imunoeletroforese.

### Eletroforese capilar

A eletroforese capilar se baseia na separação das moléculas pelo seu tamanho e propriedades físico-químicas, mediante o fluxo em tubos capilares com diâmetros internos de 15 a 100  $\mu\text{m}$  e 50 a 100 cm de comprimento. Esses capilares são preenchidos com um eletrólito condutor e submetidos à ação de um campo elétrico. Esse método oferece vantagens em relação ao uso de géis ou papel, pois possibilita a dissipação eficiente do calor e permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), aumentando a eficiência da separação e o tempo de corrida e possibilitando, assim, a separação de bandas pouco visíveis nos métodos convencionais de eletroforese. Além disso, utiliza pequenos volumes de amostra (1 a 10 nL) e pode ser totalmente automatizado, garantindo maior qualidade e rapidez aos resultados.

Na eletroforese capilar podem-se utilizar diferentes modos de separação, com mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), cromatografia eletrocínica em microemulsão (MEECK), eletroforese capilar em gel (CGE), focalização isoeletrica capilar (CIEF), isotacoforese capilar (CITP) e eletrocromatografia capilar (CEC). Essa versatilidade permite analisar desde íons até macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, em uma única coluna, desde que seja utilizado o eletrólito apropriado.

A eletroforese capilar no sequenciamento de DNA tem aplicações na identificação de pessoas: em testes de paternidade, na identificação de suspeitos de crimes, na indústria farmacêutica e na agropecuária, entre outras.

## ► Aglutinação

A reação de aglutinação caracteriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos em sua superfície.

A aglutinação específica faz parte de um processo dinâmico que ocorre em dois estágios. O primeiro estágio começa logo após a mistura das partículas recobertas pelo antígeno com os anticorpos e consiste na ligação das moléculas do anticorpo aos antígenos de superfície, por meio de ligações não covalentes, de acordo com a lei de ação das massas. O segundo estágio começa enquanto o primeiro continua e resulta das colisões que ocorrem entre as partículas, de modo que os anticorpos ligados a uma partícula se ligam a determinantes antigênicos de outra; esses anticorpos estabelecem pontes entre partículas que, após vários entrelaçamentos, formam agregados visíveis a olho nu. Ambos os estágios começam praticamente ao mesmo tempo, porém a ligação do antígeno com o anticorpo se processa em poucos segundos, enquanto a formação de agregados demora muito mais tempo.

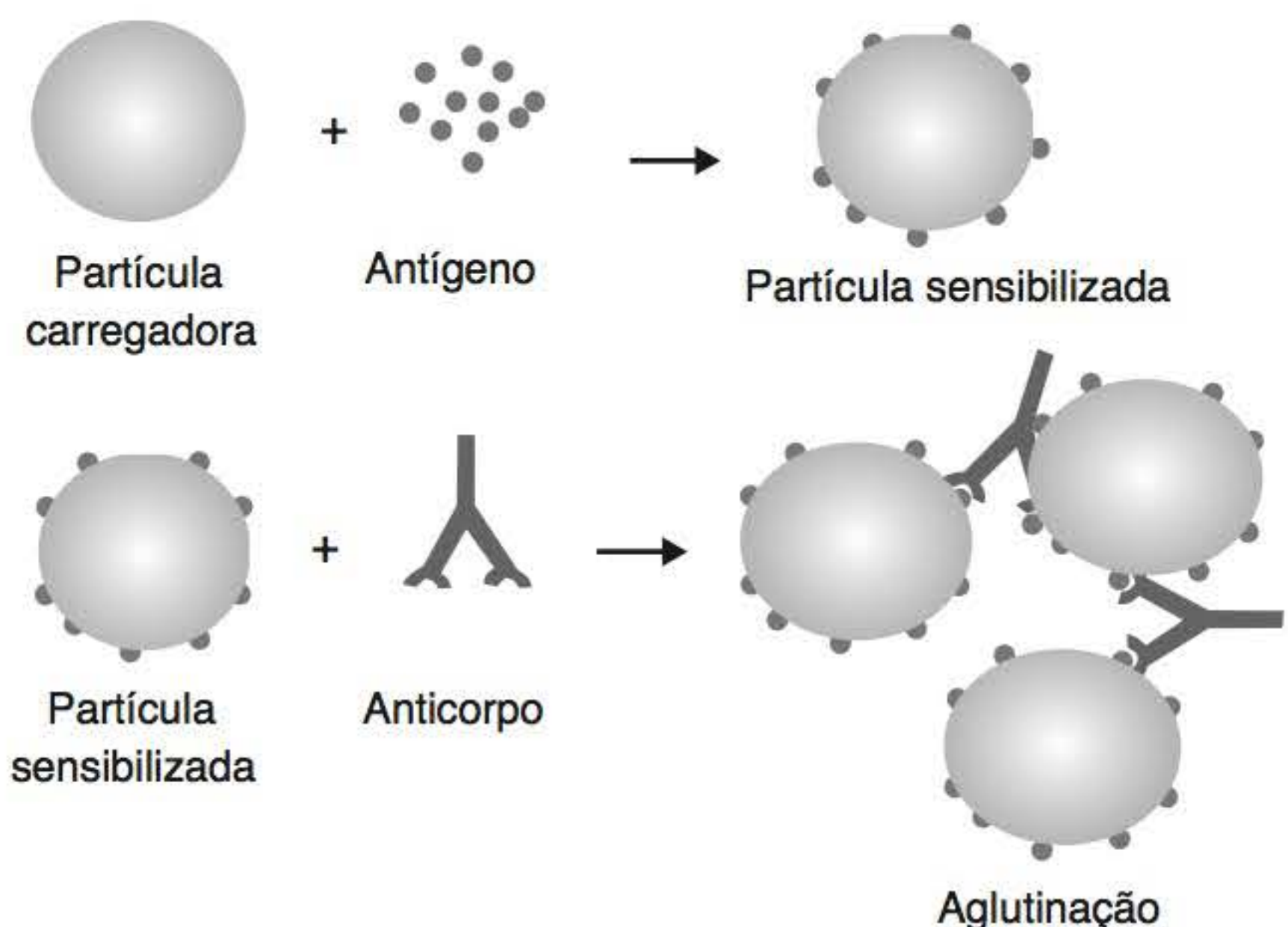
A aglutinação pode ocorrer tanto com partículas que apresentam determinantes antigênicos naturais em sua superfície (hemácias, bactérias, protozoários etc.) quanto com partículas inertes (partículas de látex, poliestireno, bentonita etc.), ou mesmo com células antigenicamente não relacionadas (hemácias, bactérias), às quais se adsorvem ou se fixam antígenos solúveis. No primeiro caso, a reação é dita aglutinação direta, e, no segundo, aglutinação indireta ou passiva (Figura 2.7).

Comparadas com a precipitação, as técnicas de aglutinação, embora semiquantitativas, são mais sensíveis e necessitam de uma quantidade de anticorpos 500 vezes menor, pois as partículas amplificam a reação.

Vários fatores interferem na formação de agregados, tais como o tipo do anticorpo (a classe IgM é 750 vezes mais eficiente do que IgG), eletrólitos, pH (ideal entre 6 e 8), macromoléculas hidrofílicas (em baixas concentrações, impedem a autoaglutinação), enzimas (afastam reações inespecíficas), tempo e temperatura.

As reações de aglutinação são empregadas para o diagnóstico laboratorial de doenças autoimunes, doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos, na detecção de hormônios, na tipagem de grupos sanguíneos etc.

Os testes de aglutinação podem ser realizados em tubos ou placas. Se o soro apresentar elevado título de anticorpos aglutinantes, pode-se observar o fenômeno de prozona, obtendo-se falsos resultados negativos. Esse efeito é eliminado empregando-se diluições seriadas do soro.



**Figura 2.7** Teste de aglutinação passiva. As células ou partículas funcionam como carregadores do antígeno ou de anticorpos. O anticorpo específico promove a aglutinação das partículas sensibilizadas.



### ▪ Teste de aglutinação direta

Na reação de aglutinação direta, utilizam-se partículas antigênicas insolúveis em sua forma íntegra ou fragmentada. Hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpo. Os testes para detectar anticorpos específicos são realizados empregando-se diluições em série do anticorpo, ante uma quantidade constante de antígeno. Após um período de incubação, a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso como o título do antissoro, isto é, o inverso da máxima diluição em que ocorre a aglutinação.

As reações de aglutinação direta que empregam hemácias como antígeno incluem a tipagem de grupos sanguíneos do sistema ABO e Rh (antígenos específicos) e a reação de Paul-Bunnell-Davidson (antígenos heterófilos).

Entre as reações que utilizam antígenos íntegros ou fragmentados de bactérias, espiroquetas e protozoários estão o teste de Widal para o diagnóstico das salmoneloses, o teste de Wright para o diagnóstico da brucelose, o teste de Weil-Felix para o diagnóstico de rickettsiose e o teste de aglutinação para leptospirose, toxoplasmose e tripanossomíase.

### Teste de inibição de hemaglutinação direta

A inibição da hemaglutinação direta baseia-se na capacidade que certos antígenos virais têm de, espontaneamente, aglutinar certos tipos de hemácias. Os anticorpos, se presentes na amostra, revestem as partículas virais, o que resulta na inibição da aglutinação, indicando teste positivo para a presença de anticorpos. Esses testes não distinguem entre IgG e IgM. Esse método é usado para detectar anticorpos contra os vírus da rubéola, sarampo, *influenza* e certos enterovírus.

### ▪ Teste de aglutinação passiva ou indireta

Para o teste de aglutinação passiva, as hemácias e as partículas inertes, como látex (polímero de poliestireno), bentonita, *sepharose*, colódio, *charcoal*, leveduras etc. podem ser sensibilizadas por adsorção passiva, devida ao contato direto com os antígenos solúveis, por adsorção via agentes químicos, como ácido tânico e cloreto de cromo, e por conjugação do antígeno por meio de ligações químicas covalentes, fornecendo reagentes estáveis. Devido à grande diversidade de antígenos que podem se ligar às células ou partículas, a aplicação dos testes de aglutinação passiva é muito variada.

### Teste de hemaglutinação passiva

A verificação de Boyden, em 1951, de que proteínas podiam ser adsorvidas a hemácias tratadas com ácido tânico e de que essas células podiam ser aglutinadas por anticorpos específicos, possibilitou o emprego dos métodos de aglutinação para a detecção de anticorpos contra várias substâncias.

As hemácias estão entre os melhores suportes de antígenos para os testes de aglutinação, pois há uma série de antígenos que pode ser ligada à sua superfície para fornecer um sistema indicador sensível na detecção de anticorpos. Além disso, os testes em placa permitem que a determinação do ponto final da reação seja feita diretamente. Por serem de fácil obtenção, empregam-se preferentemente hemácias de carneiro ou humanas do grupo O fixadas com formaldeído ou glutaraldeído, o que resolve o problema da fragilidade e permite que sejam estocadas por longos períodos. Entretanto, devido à superfície complexa das hemácias, frequentemente

são detectados anticorpos heterófilos no soro de muitos animais. Tais anticorpos devem ser removidos antes da realização do teste.

Antígenos polissacarídicos prontamente aderem a hemácias, enquanto antígenos proteicos requerem pré-tratamento com ácido tânico ou cloreto de cromo. A taninização das hemácias altera a sua superfície quanto às cargas, o que aumenta a quantidade de proteína adsorvida e torna maior a sensibilidade do sistema. Empregando-se antígenos purificados obtêm-se maiores sensibilidade e especificidade; todavia, antígenos levemente desnaturados ou agregados ligam-se melhor a hemácias taninizadas. Após a sensibilização com a concentração adequada de antígeno, as hemácias são suspensas em soluções estabilizadoras, que evitam reações inespecíficas sem diminuir a capacidade de aglutinação específica.

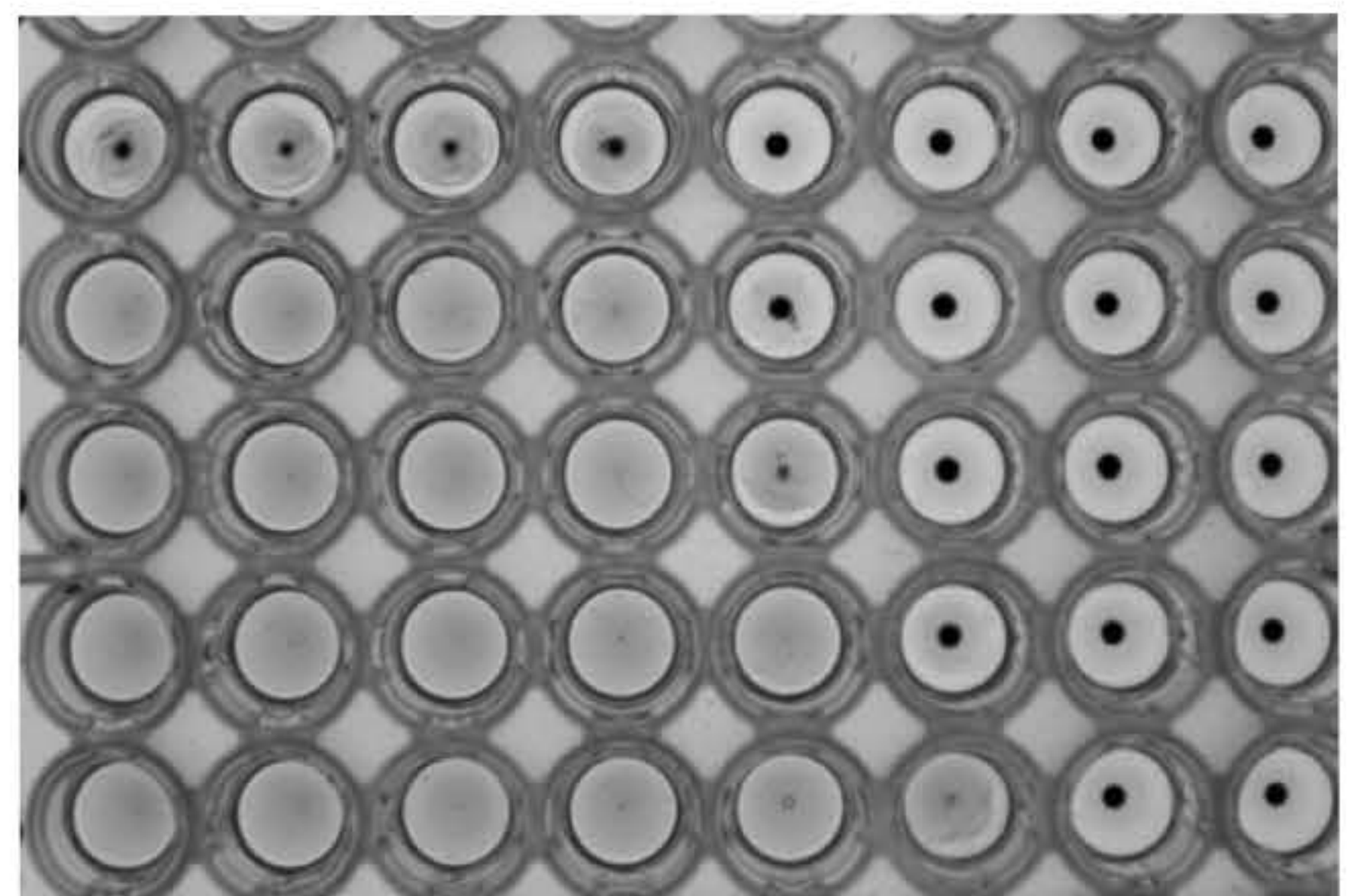
O teste em placa utiliza pequenas quantidades de reagentes e é considerado positivo quando se verifica a formação de um tapete cobrindo o fundo da cavidade da placa em “V”, e negativo quando as hemácias sedimentam formando um “botão” compacto. O título da amostra testada será o inverso da máxima diluição em que ainda se observa a formação do tapete (Figura 2.8).

O teste detecta anticorpos das classes IgG e IgM e, embora os anticorpos IgM sejam 750 vezes mais eficientes na aglutinação do que os IgG, a quantidade de antígeno necessária para obter a máxima reatividade com IgM é muito maior do que a necessária para a máxima reatividade com IgG. Empregando-se hemácias sensibilizadas com antígenos proteicos, quando adequadamente padronizado, o teste detecta anticorpos em níveis de concentração de 0,01 µg/ml. Há vários sistemas comerciais para a pesquisa de anticorpos que utilizam essa técnica, entre eles, os sistemas de *Trypanosoma cruzi*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* etc.

### Teste de inibição de hemaglutinação passiva

O teste de inibição de hemaglutinação passiva é sensível e específico na detecção de pequenas quantidades de antígenos solúveis, haptenos ou anticorpos que competem com a substância homóloga com que a hemácia foi sensibilizada.

O princípio do teste baseia-se na competição, pelos sítios de combinação do anticorpo, entre o antígeno fixado à hemácia e o antígeno solúvel ou o hapteno. O grau de inibição relaciona-se com a quantidade do antígeno presente na amostra



**Figura 2.8** Placa de hemaglutinação mostrando o teste positivo (tapete) e negativo (botão). A linha inferior mostra uma reação duvidosa (tapete e botão simultaneamente).



e, também, com a afinidade pelos sítios de combinação do anticorpo.

Esse método requer pequenas quantidades de reagentes, detecta antígeno na ordem de 0,1 a 10 µg/ml, apresenta especificidade elevada e pode ser empregado em sistemas em que antígenos solúveis ainda não foram obtidos. Tem sido empregado na detecção de antígeno na hepatite e na hemofilia.

### Teste de aglutinação do látex

Singer e Plotz, em 1956, foram os primeiros a descrever o emprego das partículas de látex para um teste de diagnóstico pesquisando fator reumatoide em amostras de pacientes. Esse método, ainda muito empregado, é a base de vários sistemas comerciais tanto qualitativos quanto semiquantitativos e automatizados.

Partículas de látex são esferas de poliestireno que podem ser utilizadas como suportes na adsorção de proteína solúvel e antígenos polissacarídicos, funcionando como sistema indicador da reação antígeno-anticorpo.

O teste pode ser empregado na pesquisa de antígenos ou de anticorpos. A aplicação mais comum ocorre na detecção do fator reumatoide, que é anticorpo da classe IgM pentamérico (também há fator reumatoide IgG e IgA) dirigido contra IgG (IgG1, IgG2, IgG4), IgA (IgA1), IgM e IgE. Adsorvendo IgG passivamente às partículas do látex, haverá a exposição dos determinantes de IgG que reagem com o fator reumatoide, resultando em aglutinação. Esse método é mais sensível e menos específico que a hemaglutinação passiva para detectar fator reumatoide. O fator reumatoide é um autoanticorpo à porção Fc de IgG agregada ou alterada, ocorrendo em doenças autoimunes, em processos agudos ou crônicos e em doenças reumáticas, infecciosas, degenerativas etc.

Essa técnica é útil também para detectar antígenos polissacarídicos bacterianos, como de *Haemophilus influenzae*, *Rickettsia* sp., estreptococos do grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* etc. no soro, urina ou liquor. Também

é empregada na detecção de fármacos e hormônios, como a β-gonadotrofina coriônica humana, na pesquisa de anticorpos na rubéola e de proteína C, que aparece no soro de pacientes na fase aguda de várias infecções, como a estafilocócica ou a estreptocócica, febre reumática etc. A presença dessa proteína é detectada com a antiproteína C ligada a partículas de látex. Em baixas concentrações, pode ser encontrada em indivíduos hígidos e frequentemente se observa o fenômeno de prozona, que pode ser evitado diluindo-se o soro.

### Teste de aglutinação de cristais de colesterol

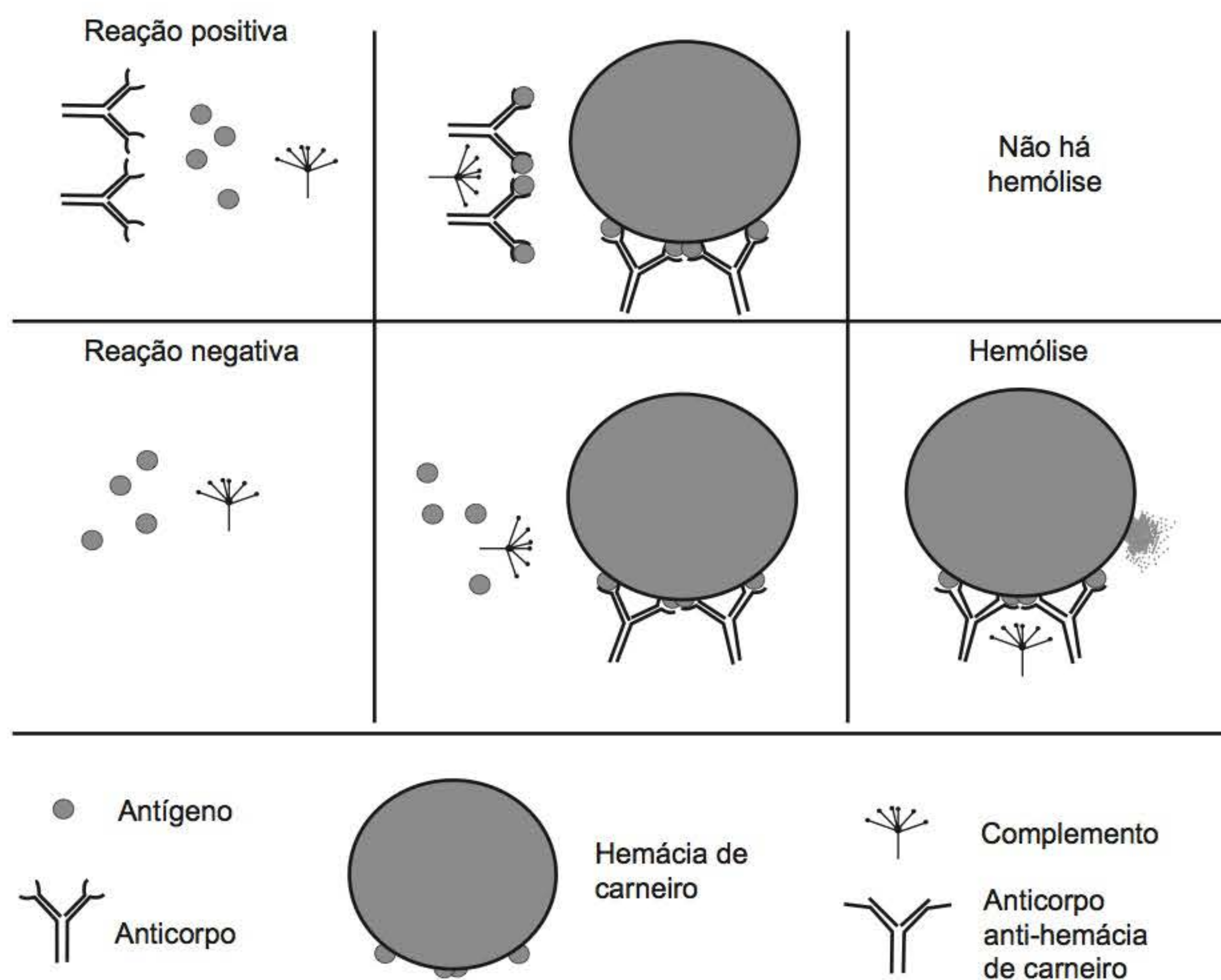
O teste de VDRL (*venereal disease research laboratory*) consiste no emprego de cristais de colesterol sensibilizados com lecitina e cardiolipina para a pesquisa de anticorpos na sífilis. Esse teste detecta anticorpos antilipídios que se formam no hospedeiro como resposta ao material de natureza lipídica, liberado pelas células lesadas no início da infecção, e ao material lipídico do próprio treponema. A leitura do teste é feita macroscopicamente, contra fundo escuro, após alguns minutos de agitação. O teste positivo apresenta a formação de flóculos, enquanto o negativo apresenta aspecto homogêneo e sem agregados.

## ► Ensaios líticos

### ▪ Fixação do complemento

A ligação antígeno-anticorpo promove a fixação do complemento, cujo consumo, *in vitro*, pode ser empregado para detectar a presença de anticorpos, antígenos ou ambos. Bordet e Gengou, em 1901, demonstraram essa reação pela primeira vez.

O teste utiliza um sistema homogêneo (não é necessária a separação entre fases) e é realizado em duas etapas (Figura 2.9). Na primeira etapa, o antígeno é incubado com o anticorpo, na fase fluida, na presença de uma quantidade definida de com-



**Figura 2.9** Teste de fixação de complemento esquematizando reações positiva e negativa para a pesquisa de anticorpos.



plemento. Se o antígeno e o anticorpo correspondentes estiverem presentes, a cascata do complemento será ativada pela via clássica e haverá consumo de complemento. Na segunda etapa, adiciona-se o sistema indicador da reação que consiste em hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo anti-hemácias de carneiro obtido em coelhos). A medida da atividade hemolítica do complemento no sistema indicador permite determinar a presença ou não de antígeno ou anticorpo na mistura inicial e sua quantidade. A atividade hemolítica remanescente pode ser quantificada empregando-se diluições seriadas da amostra a ser analisada. Tanto o anticorpo quanto o antígeno devem ser destituídos de ação anticomplementar, ou seja, não podem ativar o complemento separadamente. O complemento deve ser obtido de soro de cobaia e colhido e estocado de maneira apropriada para preservar a atividade hemolítica. Anticorpos humanos IgM, IgG1, IgG2 e IgG3 fixam complemento pela via direta, enquanto a IgA fixa complemento pela via alternativa.

O teste pode ser qualitativo ou quantitativo. O método qualitativo foi desenvolvido por Mayer *et al.*, em 1948, e baseia-se na titulação do complemento residual que não foi consumido pela reação antígeno-anticorpo com o sistema indicador. Esse método, embora sensível, é muito laborioso para fins de diagnóstico. O método quantitativo apresenta muitas variações técnicas, dentre as quais o micrométodo de Wassermann e Levine, de 1961, que permite revelar quantidades mínimas de complemento fixado. Nesse método, emprega-se uma quantidade fixa de complemento e faz-se a determinação direta do complemento residual pela adição do sistema indicador. O método requer que as concentrações de todos os componentes, exceto o da amostra em estudo, sejam predeterminadas com precisão. Todos os aspectos do teste devem ser monitorados por vários controles devido à instabilidade do complemento, à variação das hemácias e da hemolisina. A validade dos resultados obtidos com as amostras desconhecidas depende da avaliação dos resultados dos controles do teste.

Durante algum tempo, o teste de fixação de complemento foi considerado dos mais importantes no sorodiagnóstico devido à sua maior sensibilidade com relação aos testes da época. Atualmente, é utilizado na pesquisa de anticorpos fixadores de complemento, no estudo de algumas viroses e micoses sistêmicas. Apresenta a vantagem de poder ser empregado para diferentes sistemas sem mudar os parâmetros do teste, porém é complexo e trabalhoso. A tendência atual é a sua substituição por ensaios mais sensíveis e menos laboriosos.

### ▪ Ensaio de neutralização da hemólise

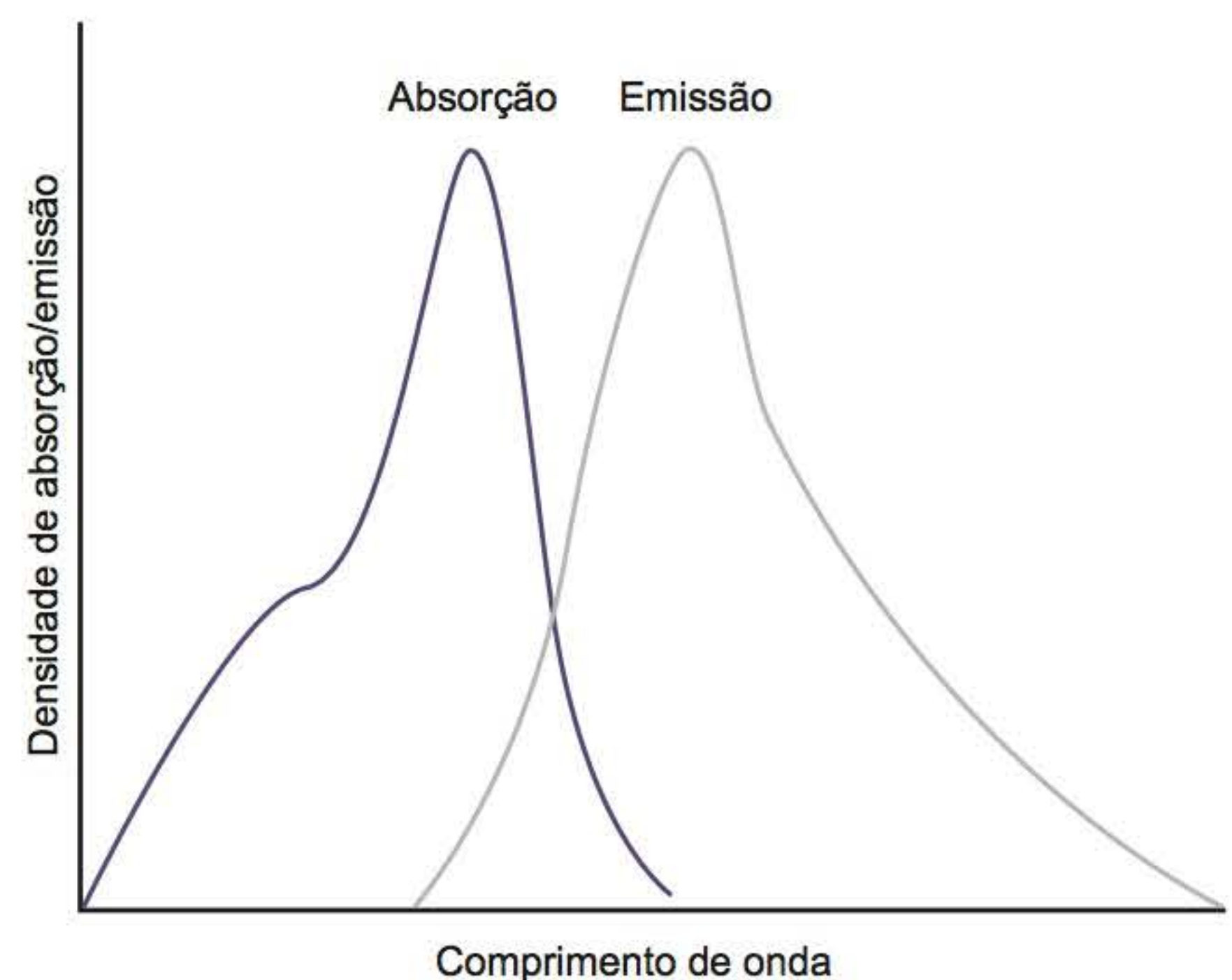
Estreptococos beta-hemolíticos do grupo A produzem várias toxinas extracelulares que estimulam a produção de anticorpos e que lisam hemácias (hemolisinas). O ensaio de neutralização é realizado em duas etapas; na primeira, incuba-se o soro do paciente (anticorpo) com a hemolisina específica (antígeno); na segunda, adicionam-se hemácias do grupo O. Se a hemolisina tiver sido neutralizada pelo anticorpo específico, as hemácias não lisam e o teste é positivo; se não havia anticorpo específico, a hemolisina fica ativa, lisa as hemácias e o teste é negativo. O teste de neutralização mais comumente empregado é o ASO para pesquisa de antiestreptolisina O.

## ► Teste de imunofluorescência

O teste de imunofluorescência é muito utilizado no diagnóstico de laboratório para a pesquisa de anticorpos e, com anticorpos monoclonais, para a pesquisa de microrganismos e seus componentes em espécimes clínicos. Baseia-se na capacidade das moléculas de anticorpo de se ligar covalentemente a fluorocromos sem perder sua reatividade específica com o antígeno. A conjugação de moléculas de anticorpo a fluorocromos foi desenvolvida com sucesso pela primeira vez por Coons, em 1941.

Fluorocromos são substâncias que, quando excitadas com luz de alta energia, absorvem luz de um comprimento de onda menor e, instantaneamente, emitem luz de comprimento de onda maior (menor energia), constituindo o fenômeno denominado fluorescência. Os espectros de absorção e de fluorescência de um fluorocromo em geral são próximos, sendo o tempo de armazenamento da energia da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  s (Figura 2.10). Os fluorocromos apresentam moléculas complexas, frequentemente sob a forma de anéis com duplas ligações. Os mais utilizados são isotiocianato de fluoresceína, lisamina-rodamina B, vermelho Texas, ficoeritrina, ácido dimetil naftalenossulfônico, isotiocianato de tetrametilrodamina, que têm espectros de emissão e de absorção diferentes, porém absorvem luz nas regiões ultravioleta e próxima do visível e emitem luz na faixa do visível. A conjugação do fluorocromo com o anticorpo se faz por meio dos grupos amino da lisina, que não são críticos para a atividade do anticorpo: ligação tiocarbamida, sulfonamida etc.

A qualidade do teste depende, em grande parte, da seleção do material empregado para o preparo dos conjugados. Antissoros de má qualidade dão origem a conjugados cujas reações apresentam elevada coloração de fundo, enquanto conjugados preparados com antissoros potentes podem ser empregados em altas diluições, o que possibilita a obtenção de uma proporção sinal/ruído maior, ou seja, reações mais sensíveis e com menor reação de fundo. O anticorpo a ser marcado deve ser uma preparação purificada de gamaglobulina para aumentar a eficiência da coloração e evitar colorações não específicas, pois os fluorocromos também marcam a albumina e as frações  $\alpha$ - e  $\beta$ -globulinas. A fração gamaglobulina



**Figura 2.10** Espectro de absorção e de emissão de um composto fluorescente.



pode ser obtida por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. Muitas vezes, é necessário purificar a gamaglobulina empregando-se, por exemplo, imunoabsorventes, pois a conjugação deve se limitar o máximo possível ao anticorpo. Desse modo, a marcação do anticorpo pelo fluorocromo resulta em conjugado específico, em que se deve determinar a concentração da gamaglobulina, a relação fluoresceína/proteína e o título para determinar a atividade imunológica. Com anticorpos policlonais, a relação fluoresceína/proteína ideal é 2,5 a 5,5, satisfatória para detectar antígenos em bactérias ou protozoários (grande número de determinantes antigênicos). Com anticorpos monoclonais, ou na detecção de antígenos com pequeno número de determinantes, é necessária uma relação fluoresceína/proteína maior para obter a sensibilidade desejada.

A intensidade de luz emitida pela fluoresceína depende do pH do meio, sendo máxima em pH 8,5. Por isso, as preparações são montadas com glicerina alcalina. O uso de corantes, como o azul de Evans ou o vermelho congo, diminui a coloração de fundo e melhora o contraste.

O microscópio de fluorescência é composto por uma fonte de luz de alta intensidade (lâmpada de mercúrio ou de quartzo-halogênio), filtros de excitação, que relacionam o comprimento de onda capaz de ativar a fluorescência, e filtros barreira, que removem interferentes da luz e permitem alta transmissão da fluorescência emitida. A lâmpada de mercúrio é de instalação cara e tem vida média de 200 h ou menos. As lâmpadas de quartzo-halogênio são baratas, podendo ser ligadas e desligadas, não havendo necessidade de esperar determinado tempo para que resfriem, e não diminuem de eficiência com a utilização. Os microscópios podem ser de transiluminação ou de epi-iluminação. Este último tipo apresenta as vantagens de poder combinar a fluorescência com luz transmitida para exame de contraste de fase; além disso, os sistemas intercambiáveis de filtros permitem o exame da amostra em diferentes comprimentos de onda no caso de colorações com mais de um fluorocromo.

## ■ Teste de imunofluorescência direta

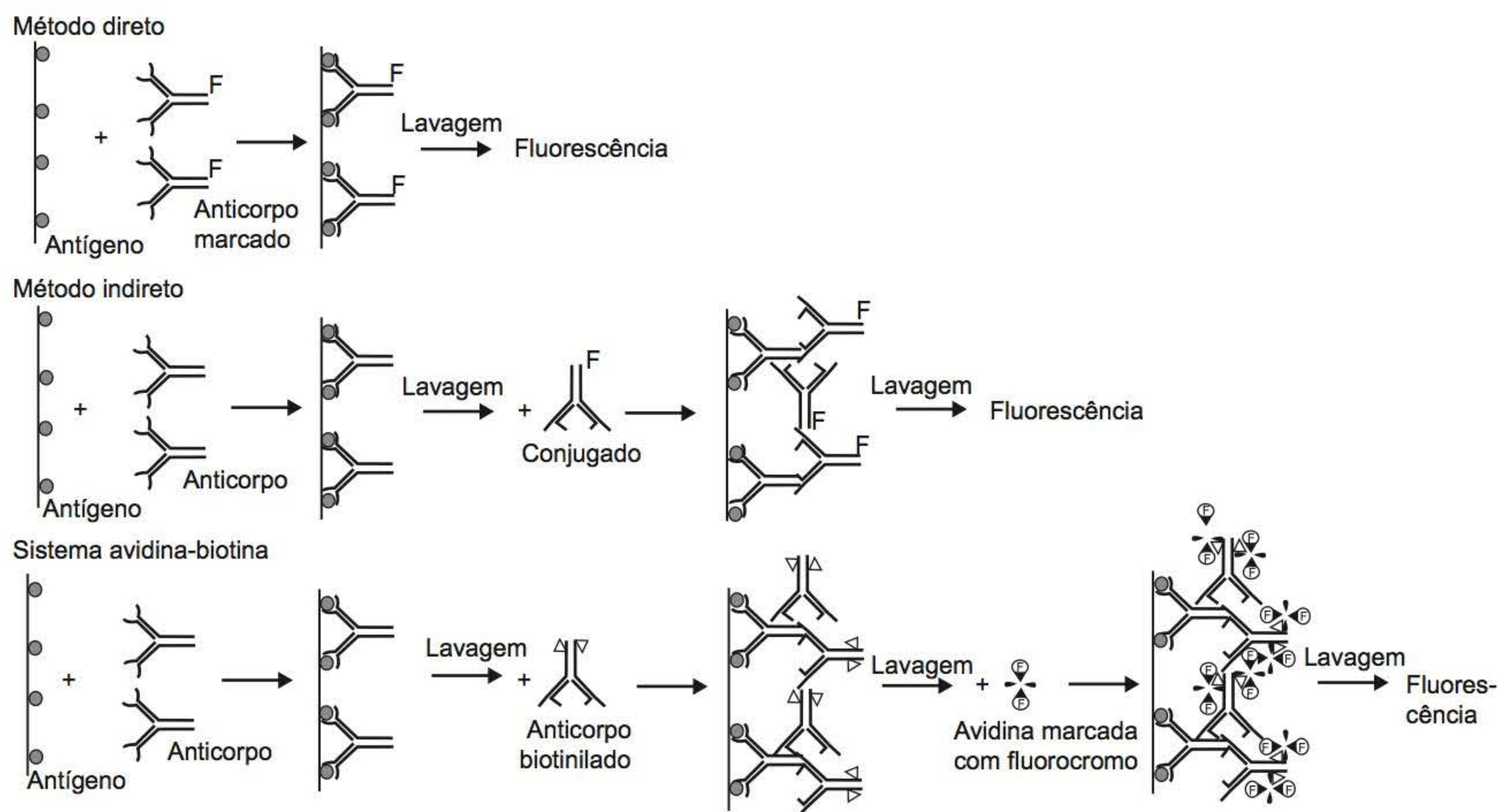
O teste de imunofluorescência direta (Figura 2.11) é empregado na pesquisa e localização de antígenos em células ou tecidos, por meio de um anticorpo específico marcado com fluorocromo (conjugado). O conjugado se fixa ao antígeno, formando um imunocomplexo estável. O anticorpo não ligado é removido por lavagens e o preparado é observado em microscópio de fluorescência. Foi desenvolvido por Coons *et al.*, em 1942, para demonstrar antígenos microbianos em tecidos.

O antissoro específico para o antígeno a ser pesquisado é obtido em espécies heterólogas e deve ser de alta especificidade e elevada potência. Anticorpos monoclonais podem ser utilizados.

O teste apresenta elevada sensibilidade e especificidade, mas requer o preparo de um conjugado para cada sistema que se queira estudar. Paralelamente ao teste desejado, deve-se incluir um preparado para avaliar a especificidade, utilizando-se o método de bloqueio (o antígeno é incubado com anticorpo específico, não marcado, antes da adição do conjugado específico) ou neutralização (o anticorpo marcado é absorvido com o antígeno antes de ser adicionado ao preparado).

A principal aplicação da imunofluorescência direta ocorre na imunocitoquímica, na demonstração de vários antígenos de células e tecidos, principalmente nas doenças imunológicas renais e de pele. Nos casos de disfunções glomerulares e tubulointersticiais, doenças do tecido conectivo e outras disfunções, a imunofluorescência direta auxilia na avaliação do material de biopsia do rim ou da pele, possibilitando a demonstração de imunoglobulinas ligadas a tecidos, de componentes do complemento, produtos relacionados com a fibrina etc.

Esse teste também tem sido utilizado na pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Legionella* sp., *Escherichia coli*, estreptococos beta-hemolíticos do grupo A e vários vírus, como os do herpes simples tipos 1 e 2, o citome-



**Figura 2.11** Teste de imunofluorescência. Esquema dos métodos direto, indireto e com o sistema avidina/estreptavidina-biotina.



galovírus, os da *influenza* tipos A e B, os da *parainfluenza* 1, 2 e 3, o da varicela-zóster e o adenovírus.

Empregando-se anticorpos de diferentes especificidades marcados com fluorocromos contrastantes, podem-se localizar componentes diferentes dentro de uma célula, diferenciar uma célula de outra ou localizar a distribuição de antígenos em células ou tecidos.

### ▪ Teste de imunofluorescência indireta

O teste de imunofluorescência indireta tem sido empregado para amplificar o sinal e aumentar a sensibilidade de detecção. Pode ser empregado na pesquisa de antígenos ou de anticorpos.

#### Para a pesquisa de antígenos

Consiste na incubação da célula ou tecido em que se quer pesquisar o antígeno com o anticorpo específico obtido em animal conhecido ou monoclonal, levando à formação de um imunocomplexo. Após a lavagem, a preparação é incubada com um conjugado de anti-imunoglobulina produzida em outra espécie de animal (Figura 2.11).

Essa técnica apresenta vantagens com relação à direta. É mais sensível, pois o anticorpo não marcado tem mais sítios de ligação que o antígeno, ou seja, ocorre uma amplificação com o uso de dois anticorpos; é mais fácil de ser controlada e pode-se utilizar um único conjugado para diferentes sistemas. Por exemplo, se for empregado anticorpo específico para o antígeno obtido em coelho, o conjugado será imunoglobulina anticoelho marcada. Como desvantagens, necessita maior tempo de reação, mais reagentes e pode ser menos específica. O teste pode ser utilizado nos mesmos sistemas que empregam o método direto, com aumento de sensibilidade. A pesquisa de plasmódios em hemácias é um exemplo.

#### Para a pesquisa de anticorpos

O teste de imunofluorescência, descrito por Weller e Coons em 1954, tem sido muito empregado na rotina laboratorial para a detecção de anticorpos no soro e outros fluidos biológicos. Antígenos padronizados são fixados a lâminas de vidro. O soro do paciente é diluído, colocado sobre o antígeno e incubado para que seja formado o complexo antígeno-anticorpo. Após lavagens, a preparação é incubada com o conjugado fluorescente e, se houver anticorpo no soro, o conjugado (fluoresceína ligada à anti-imunoglobulina) reage com o anticorpo específico para o antígeno (Figura 2.11). Utilizando-se diluições seriadas do soro é possível determinar o título de anticorpos, que será o inverso da máxima diluição em que se observa fluorescência.

Quando se deseja detectar anticorpos específicos de uma determinada classe ou subclasse de imunoglobulinas, é necessário utilizar antissoros específicos para as cadeias pesadas das classes que se quer pesquisar e sem reatividade para cadeias leves ou para outras cadeias pesadas. Assim, por exemplo, conjugados anti-IgG cujos antissoros têm reatividade contra as cadeias leves,  $\kappa$  e  $\lambda$ , detectam anticorpos contra todas as classes de imunoglobulinas reagentes.

Para a pesquisa de anticorpos durante a fase aguda da infecção, emprega-se um conjugado anti-IgM que deve ser específico para cadeias pesadas. A imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos IgM está sujeita a falsos resultados positivos devido à presença de fator reumatoide no soro testado. Quando o anticorpo IgG se liga ao antígeno ocorre mudança conformacional no IgG, que expõe novos

antígenos em sua região Fc aos quais o fator reumatoide se liga. É necessário utilizar métodos de absorção ou separação do fator reumatoide. Também podem ser observadas reações falso-positivas devidas a anticorpos heterólogos. Podem ocorrer resultados falso-negativos quando anticorpos IgG competem ou inibem IgM na ligação com os sítios do antígeno. Nesses casos, é necessário separar IgG de IgM.

A maior intensidade de fluorescência observada nas técnicas indiretas se deve ao maior número de moléculas fluorescentes que irão corresponder a cada determinante antigênico. Jancovic, em 1959, empregou a técnica em camada tríplice para demonstrar antígenos do sistema Rh em hemácias utilizando anticorpos humanos anti-Rh, anticorpos anti-imunoglobulina humana, produzidos em coelhos, e anticorpos anti-imunoglobulina de coelho, produzidos em carneiros, marcados pela fluoresceína.

A imunofluorescência indireta é o teste de referência na sorologia de muitas doenças. Apresenta várias vantagens, pois é sensível, específica, reprodutível, de padronização e execução simples, o mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes e podem-se determinar as classes e subclasses de anticorpos empregando-se conjugados específicos. A necessidade de microscópio de fluorescência, a subjetividade na leitura e a não automação representam limitações do teste.

O teste tem sido empregado para detectar anticorpos em vários sistemas, tais como *Treponema pallidum* (FTA-ABS), *Toxoplasma gondii*, vírus da rubéola, citomegalovírus, herpes-vírus simples, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* etc. Outra de suas maiores aplicações ocorre na pesquisa de auto-anticorpos contra diferentes estruturas orgânicas.

#### Sistema avidina/estreptavidina-biotina

O sistema avidina/estreptavidina-biotina é uma técnica de amplificação do sinal da reação (Figura 2.11). A forte interação entre a avidina e a biotina foi descoberta em 1941 por Snell. Essa ligação, com constante de associação da ordem de  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , tem sido considerada como a interação biológica não covalente mais forte que se conhece. A avidina é uma glicoproteína tetramérica, com 66 a 69 kDa (10% são carboidratos), encontrada na albumina do ovo de pássaros, répteis e anfíbios. As quatro subunidades da avidina são idênticas e cada uma pode se ligar à biotina. A biotina é uma vitamina do complexo B encontrada em todas as células. A estreptavidina é uma proteína bacteriana tetramérica de 60 kDa, composta de subunidades idênticas, homóloga à avidina, isolada do *Streptomyces avidinii*, e é mais utilizada do que a avidina. Também tem quatro sítios de ligação de alta afinidade para a biotina ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ), porém tem um ponto isoelétrico aproximadamente neutro e é livre de cadeias laterais de carboidratos, apresentando menor tendência de se ligar inespecificamente.

Pesquisas realizadas na década de 1970 estabeleceram o sistema avidina-biotina como uma ferramenta poderosa em ciências biológicas. Logo depois, pesquisadores como Bayer e Wilchek desenvolveram novos métodos e reagentes com anticorpos biotinilados e outras biomoléculas.

Os compostos da biotina, disponíveis no mercado, contêm um domínio quimicamente ativo, como N-hidroxissuccinimida ou sulfo-N-hidroxissuccinimida, que se liga diretamente aos grupos  $\epsilon$  dos aminoácidos. A avidina/estreptavidina pode ser saturada com moléculas de fluoresceína sem perder sua capacidade de ligação à biotina, fornecendo um conjugado cuja fluorescência específica é bem intensa. A biotina pode ser ligada covalentemente a um anticorpo e, em uma segunda



etapa, reagir com a avidina/estreptavidina conjugada a um fluorocromo. Após a reação do antígeno com o anticorpo não marcado, a biotina, marcada com o segundo anticorpo, é adicionada. Como muitas moléculas de biotina podem se ligar a um anticorpo, a adição da avidina/estreptavidina marcada resulta em amplificação da fluorescência.

O sistema tem outras vantagens, pois há um mínimo de inespecificidade de ligação do conjugado a outros substratos e pode-se empregar o conjugado de avidina/estreptavidina na detecção de anticorpos marcados com biotina, independentemente da espécie de origem ou isótipo. O mesmo anticorpo biotinilado pode ser utilizado com diferentes conjugados de avidina/estreptavidina, como fluoresceína (fluorescência verde), ficoeritrina (fluorescência vermelha), peroxidase (microscopia óptica) ou ferritina (microscopia eletrônica). Esse sistema também é útil com anticorpos monoclonais, pois a biotinilação é rápida, branda e eficiente, não alterando a capacidade de ligação do anticorpo ao antígeno.

Atualmente, a técnica tem ampla aplicação em pesquisa e diagnóstico. Além da imunofluorescência, tem sido empregada no *immunoblotting*, ELISA, ELISPOT, imunoperoxidase etc. Também pode ser empregada em ensaios de purificação para capturar biotina marcada com proteínas ou moléculas de ácido nucleico.

## ► Técnicas com marcadores radioativos

### ■ Radioimunoensaio

O radioimunoensaio é um dos métodos mais sensíveis para a análise quantitativa das reações antígeno-anticorpo, permitindo medidas rápidas e precisas; mesmo em preparações não purificadas, apresenta limiar de detecção da ordem de nanogramas ou picogramas. Como limitações destacam-se o custo do teste, a meia-vida dos reagentes e o risco operacional. Apesar das limitações inerentes ao emprego de radioisótopos, ainda é muito utilizado principalmente na pesquisa, embora na rotina laboratorial a tendência seja a substituição por métodos que utilizam marcadores não radioativos.

A base para o desenvolvimento do radioimunoensaio veio dos estudos *in vivo* de Berson, Yalow *et al.*, em 1956, que descobriram a possibilidade de detecção de anticorpos anti-insulina em pacientes tratados com o hormônio, por meio da medida da ligação de insulina marcada a esses anticorpos. A insulina não marcada, competitivamente, inibia a ligação da insulina marcada ao anticorpo. Em 1960, Yalow e Berson desenvolveram um ensaio para detectar e quantificar insulina no soro de pacientes utilizando anticorpos anti-insulina. No mesmo ano, Ekins desenvolveu um ensaio para tiroxina humana. O princípio básico era o mesmo, embora Ekins empregasse uma globulina carregadora do hormônio em vez de anticorpo. Em 1977, Yalow foi indicado para o Prêmio Nobel de Medicina pelo “desenvolvimento do radioimunoensaio para hormônios peptídicos”.

O radioimunoensaio tem aplicação muito ampla na toxicologia, farmacologia, endocrinologia, imunologia etc. Pode ser utilizado para quantificar hormônios, fármacos, substâncias ilícitas, marcadores tumorais, alergênicos e anticorpos associados à alergia, e antígenos e anticorpos em infecções por vírus, bactérias etc. Há muitas variações, mas o princípio é o mesmo: a quantidade de reagente marcado (antígeno ou anticorpo) quantifica o antígeno ou o anticorpo não marcado na amostra.

O ensaio pode ser competitivo ou apresentar excesso de reagente.

O anticorpo empregado pode ser um antissoro policlonal, preparado por imunização com a substância que se quer determinar purificada, ou pode ser um anticorpo monoclonal produzido *in vitro*. No radioimunoensaio de competição, a quantidade de reagente é limitada e a diluição de anticorpo utilizada deve ser determinada por titulação com pequena quantidade da substância que se quer determinar marcada. O título do antissoro é função da concentração mínima da substância que pode ser medida, depende da avididade do anticorpo ou populações de anticorpos presentes e varia, de acordo com a natureza do ensaio, de  $1:10^5$ - $1:10^6$  ou mais.

Vários radioisótopos podem ser utilizados, mas os marcadores para reagentes sorológicos devem apresentar meia-vida compatível. Isótopos como  $^{125}\text{I}$  (meia-vida de 57,5 dias) e  $^{131}\text{I}$  (meia-vida de 8 dias) são os mais empregados na Imunologia.

Como qualquer ensaio com ligantes, o radioimunoensaio compreende três estágios: construção de curva de calibração, interpolação dos resultados e controle de qualidade. A curva de calibração é construída a partir de uma série de diluições com concentrações conhecidas da substância a ser determinada, que são chamadas de padrões ou calibradores. Após a realização dos ensaios, a medida da resposta é feita por contagem radioativa, cujo método depende do tipo de radiação emitida. Para radiações alfa e beta utiliza-se um contador de cintilações, e, para radiação gama, um contador gama de cristal sólido. Após a contagem, constrói-se uma curva de calibração que expressa a relação entre a concentração do calibrador e a resposta. Estima-se a concentração da substância em teste processando a amostra do mesmo modo que os calibradores e fazendo-se a interpolação da concentração que corresponde à resposta observada. Visto que qualquer medida envolve erros, os resultados do ensaio devem ser acompanhados de limites de confiança determinados estatisticamente. Também é importante fazer um controle dos erros sistemáticos e ocasionais, incluindo amostras de concentração conhecida em cada partida de ensaios.

Uma etapa crítica e que introduz a maior fonte de erro do radioimunoensaio é a separação das frações livre e ligada da substância marcada. Essa separação pode ser realizada por vários processos, porém nenhum dos métodos é perfeito, tendo cada um suas vantagens e desvantagens, dependendo da diferença de tamanho entre a substância marcada livre e a ligada. As técnicas mais empregadas são a imunoprecipitação (precipitação do duplo anticorpo), a separação química (sulfato de amônio, etanol, polietilenoglicol etc.) e as técnicas com adsorventes (talco, sílica, resinas, proteína A, celulose etc.). Uma alternativa à separação das frações livre e ligada é a imobilização de um dos reagentes a uma fase sólida, tanto por adsorção quanto por conjugação covalente, tornando mais rápida e fácil a separação e permitindo que grande número de amostras seja processado rapidamente. Há dois tipos de sistemas de fase sólida, com matrizes particuladas (celulose, agarose) ou com superfície contínua (tubos, discos, placas).

### Radioimunoensaio de fase sólida

No radioimunoensaio de fase sólida, um dos reagentes é imobilizado nas cavidades de placas plásticas de microtitulação. O emprego desses ensaios de fase sólida facilita a lavagem, eliminando a necessidade de centrifugação, especialmente no passo em que é necessário remover todos os traços de material radioativo não ligado. Essa técnica é mais rápida e necessita de menor quantidade de reagentes.



As placas são sensibilizadas com antígeno ou anticorpo, cuja concentração ótima deve ser empiricamente determinada para cada sistema. A placa deve ser bloqueada para evitar a adsorção não específica dos reagentes. Após as incubações, são feitas lavagens das placas com tampões apropriados a fim de remover as substâncias não ligadas ao suporte. Há diversas variações no radioimunoensaio, adaptadas de acordo com o objetivo do teste. Serão comentados os métodos de competição com antígeno marcado, de competição com anticorpo marcado e o ensaio imunorradiométrico (IRMA) para a pesquisa de antígeno.

#### Radioimunoensaio de competição com antígeno marcado

No radioimunoensaio de competição com antígeno marcado (Figura 2.12), uma quantidade fixa e limitada de anticorpo é ligada a um suporte sólido. Adiciona-se uma quantidade fixa e pequena de antígeno marcado, misturada com a amostra em teste ou com as soluções padrão que contenham concentrações conhecidas do antígeno não marcado. Após um período de incubação, remove-se o antígeno não ligado e faz-se a medida da radioatividade da fase sólida. O antígeno da amostra ou das soluções padrão inibe, por competição, a ligação do antígeno marcado ao anticorpo imobilizado na fase sólida, de modo que, quanto maior a quantidade de antígeno na amostra ou no padrão, maior a fração de antígeno marcado livre. A quantidade de antígeno que se liga depende tanto de sua concentração quanto da afinidade do anticorpo pelo antígeno. Os resultados das soluções padrão de concentração conhecida são utilizados para construir a curva de inibição da res-

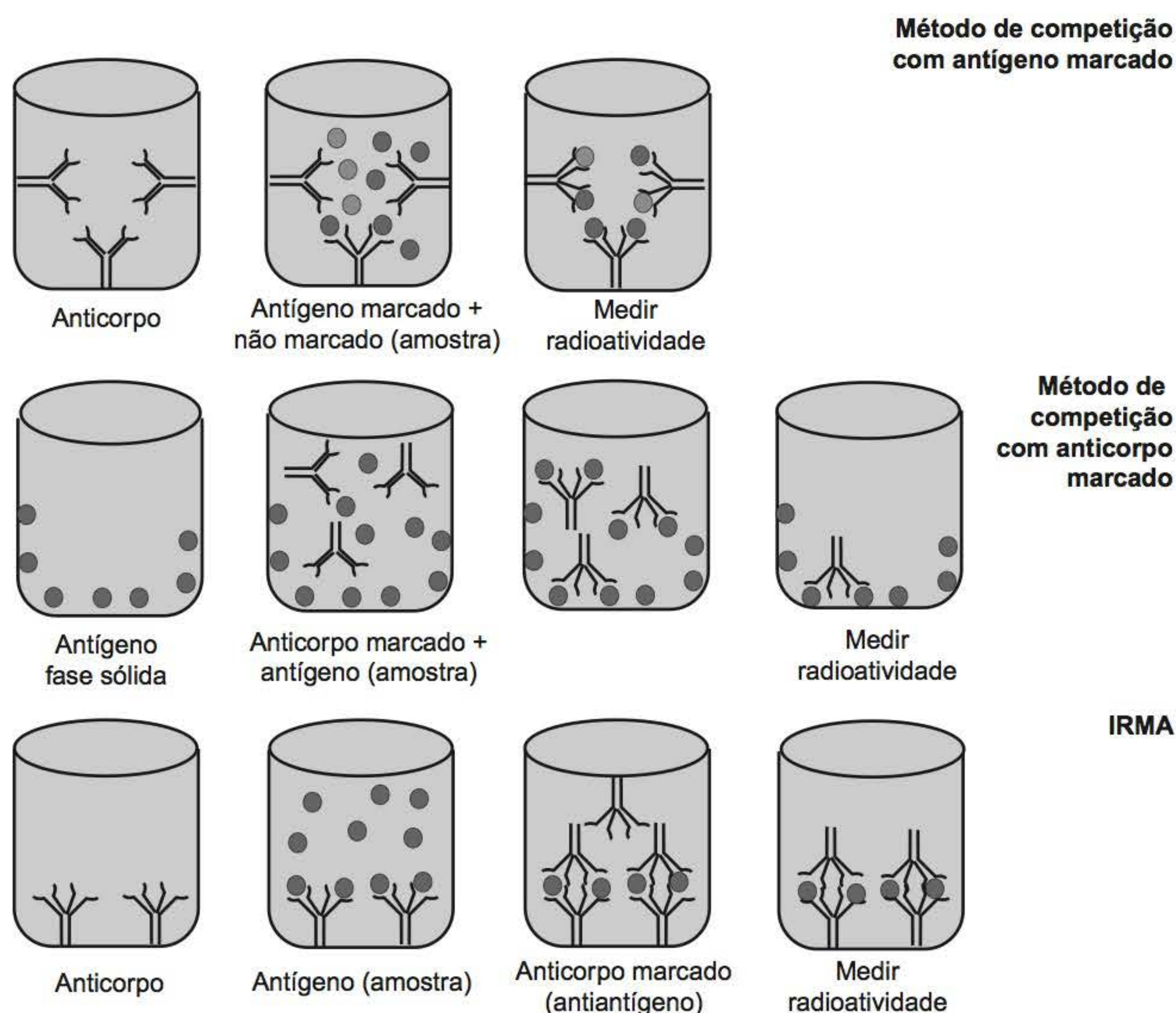
posta radioativa em função da concentração do antígeno. A partir da resposta obtida, a concentração do antígeno em teste é estimada por interpolação na curva.

#### Radioimunoensaio de competição com anticorpo marcado

No radioimunoensaio de competição com anticorpo marcado (Figura 2.12), uma quantidade fixa do antígeno é imobilizada em um suporte sólido. Adiciona-se uma quantidade fixa de anticorpo marcado específico, misturada com a amostra em teste ou uma série de soluções padrão com concentrações variadas do antígeno solúvel. Após um período de incubação, o anticorpo marcado que não se ligou à fase sólida e o antígeno solúvel são removidos por lavagem e faz-se a medida da radioatividade da fase sólida. O anticorpo específico pode ser marcado diretamente ou pode estar ligado a uma anti-imunoglobulina marcada. O antígeno solúvel da amostra ou das soluções padrão inibe, por competição, a ligação do anticorpo específico ao antígeno imobilizado na fase sólida, de modo que, quanto maior a concentração de antígeno na amostra em teste, ou nas soluções padrão, menor será a quantidade de anticorpo marcado ligada à fase sólida. Os resultados das soluções padrão de concentração conhecida são utilizados para construir a curva de inibição da resposta radioativa em função da concentração do antígeno. A partir da resposta obtida, a concentração do antígeno em teste é estimada por interpolação na curva.

#### Ensaio imunorradiométrico

Miles e Hales, em 1968, descreveram um sistema alternativo do radioimunoensaio em que anticorpos monoespecíficos marcados são utilizados para quantificar o antígeno. No radioimunoensaio convencional, a quantidade do anticorpo



**Figura 2.12** Radioimunoensaio. Esquema dos métodos de competição com antígeno marcado, de competição com anticorpo marcado e do ensaio imunorradiométrico (IRMA) para a pesquisa de antígenos.



na fase sólida é limitada, sendo um reagente proporcional, e o antígeno fica em excesso. No ensaio imunorradiométrico, o anticorpo deve estar em excesso na fase sólida. O emprego de anticorpos monoclonais facilita e refina o ensaio, tornando-o útil para a detecção de antígenos proteicos.

No ensaio imunorradiométrico que utiliza o sistema de “sanduíche” de dois sítios ou duplo anticorpo (Figura 2.12), uma quantidade fixa de anticorpo é imobilizada em um suporte. A solução teste, com quantidade desconhecida de antígeno, ou as soluções padrão, com concentrações conhecidas do antígeno, são adicionadas. Após a incubação, remove-se o antígeno não ligado e adicionam-se anticorpos marcados específicos para o antígeno, com sítio de ligação diferente do sítio do anticorpo de fase sólida. O anticorpo marcado não ligado é removido por lavagem e faz-se a medida da radioatividade da fase sólida. Quanto maior a concentração de antígeno na amostra ou nas soluções padrão, maior a quantidade de anticorpo marcado ligado e maior a radioatividade. Os resultados das soluções padrão de concentração conhecida são utilizados para construir a curva de ligação do anticorpo marcado em função da concentração do antígeno. A partir da resposta obtida, a concentração do antígeno em teste é estimada por interpolação na curva. Comparado ao radioimunoensaio de competição, o IRMA tem tempos de incubação menores, maior precisão e, teoricamente, maior sensibilidade.

## ▪ Autorradiografia

A autorradiografia ou radioautografia é um método que utiliza uma emulsão sensível à radiação para registrar a distribuição espacial de isótopos radioativos em determinado tecido, célula, organela ou molécula, podendo localizar substâncias, estruturas ou processos biológicos.

Além de ser útil em uma série muito grande de aplicações, como na microscopia eletrônica e na cromatografia, a autorradiografia pode ser utilizada na revelação da reação antígeno-anticorpo em várias técnicas, como *immunoblotting* e *dot-blot*, e na visualização de precipitados em gel, como nas técnicas de imunodifusão, imunoeletroforese e imunofixação. Os radioisótopos mais comumente utilizados na autorradiografia para marcar antígenos ou anticorpos são  $^3\text{H}$ ,  $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ . Com exceção do  $^{125}\text{I}$ , que emite radiação gama, os demais emitem partículas beta.

Os filmes de radiografias de alta velocidade são os mais empregados nos métodos de detecção de radioisótopos em superfícies planas, tais como géis de agarose ou acrilamida, filtros de nitrocelulose etc. Utilizam emulsões sensíveis quanto à capacidade de reagir efetivamente à luz (fótons) e a radiações ionizantes como raios gama, elétrons e partículas beta, fornecendo uma boa combinação de sensibilidade e resolução. Ao mesmo tempo, não necessitam de investimento em equipamentos caros. Os filmes de raios X comumente utilizados são formados por uma camada de emulsão sensível à radiação e um suporte flexível. A camada de emulsão é feita de pequenos cristais de haletos de prata (brometos, cloretos ou misturas de haletos, incluindo iodetos), suspensos em gelatina.

Para a realização da autorradiografia os preparados devem ser secos. Os géis de agarose e poliacrilamida podem ser utilizados sem secar, porém apresentam sensibilidade e resolução menores. Além disso, a secagem evita a difusão das bandas.

Em linhas gerais, o processo da autorradiografia é constituído por três etapas básicas: aplicação da emulsão, exposição e desenvolvimento ou revelação. Após a aplicação da emulsão, o tempo de exposição varia de acordo com o isótopo

empregado. Durante esse período de exposição, a radiação ionizante emitida pelo decaimento da substância radioativa interage com cada cristal de haleto de prata individualmente, promovendo a liberação de elétrons no cristal e dando origem a imagens latentes (invisíveis), que, na revelação da emulsão, promovem a redução do haleto de prata para prata metálica. Apenas os cristais de haleto de prata que foram atingidos por uma partícula são reduzidos à prata metálica, enquanto cristais não expostos não se transformam em grânulos de prata. Essas alterações na emulsão são semelhantes às que ocorrem em um processo fotográfico comum. Após o desenvolvimento do processo fotográfico, os pontos pretos ou grânulos da imagem autorradiográfica formada localizam o sítio da emissão radioativa.

Três métodos de exposição podem ser utilizados com géis ou membranas: autorradiografia direta, fluorografia e telas intensificadoras. O método de escolha dependerá do nível de penetração da radiação do isótopo empregado. Há diferenças entre a sensibilidade e a resolução desses métodos. A maior resolução é obtida na autorradiografia direta, em que partículas beta ou raios gama interagem diretamente com os cristais do haleto de prata na emulsão do filme radiográfico. A fluorografia e as telas intensificadoras são métodos indiretos que promovem aumento de sensibilidade pela conversão das emissões radioativas em luz.

## Autorradiografia direta

Na autorradiografia direta, o filme de radiografias é colocado o mais próximo possível da amostra, em um recipiente à prova de luz, e exposto a qualquer temperatura conveniente. Após a exposição, o filme é removido e processado de acordo com as instruções do fabricante, manual ou automaticamente. Esse método é simples e fornece ótima resolução, com moderada sensibilidade para isótopos emissores de beta de alta ou média energia (exceto  $^3\text{H}$ , que é emissor de beta de baixa energia). Produz imagens quantitativas, em que a absorbância da imagem do filme é diretamente proporcional à radioatividade, até o limite de saturação do filme. É o método de escolha quando a resolução espacial é mais importante do que a sensibilidade. Necessita de um tempo maior de exposição do que os outros métodos.

Esse método é recomendado com  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ , em géis de acrilamida ou agarose e com  $^{32}\text{P}$  e os emissores gama, em qualquer tipo de amostra plana, quando se necessita de maior resolução. Com  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ , em papel ou membrana de nitrocelulose, tanto a resolução quanto a sensibilidade são elevadas nessa técnica.

## Fluorografia

A eficiência de detecção de radioisótopos, que emitem partículas beta de baixa energia, depende tanto da energia de emissão do isótopo quanto da proporção de acessibilidade das moléculas radioativas na amostra. Assim, quando emissores de beta de baixa energia, como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ , estão localizados em agregados ou géis de acrilamida ou agarose, ou amostras similares, as partículas beta são absorvidas pela amostra e não conseguem reagir com o filme. Para solucionar esse problema pode-se empregar a fluorografia, método que aumenta a detecção do sinal radioativo utilizando a impregnação da amostra com um cintilador orgânico, como o PPO (2,5-difeniloxazol).

Na fluorografia as partículas beta da amostra excitam o cintilador, de modo a emitir luz ultravioleta ou azul, que não é absorvida pela amostra, podendo ser liberada mais livremente e produzindo uma imagem fotográfica, em vez de autorradio-



gráfica, no filme de radiografias. Vários reagentes fluorográficos e procedimentos têm sido descritos. Eles diferem na sensibilidade, qualidade da imagem, tempo de preparação, custo e conveniência.

Esse método necessita de menor tempo de exposição e é mais sensível, porém apresenta menor resolução da imagem e necessita de exposição a baixa temperatura ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). Além disso, para obter uma resposta quantitativa do filme e máxima sensibilidade com pequena quantidade de radioatividade, é necessário pré-expor o filme a um *flash* de luz instantâneo.

A maioria das aplicações da fluorografia refere-se principalmente a géis de poliacrilamida, sendo também aplicada em papel, membrana de nitrocelulose etc. A eficiência de detecção de  $^{14}\text{C}$  e  $^{35}\text{S}$  em géis de poliacrilamida pode ser até 10 vezes maior do que no método direto, porém, quando esses isótopos são utilizados em marcações em membranas de nitrocelulose, como no *immunoblotting*, o método direto é eficiente, não sendo necessário empregar fluorografia.

Esse método é recomendado com  $^3\text{H}$ , em géis de acrilamida e agarose, papel e membrana de nitrocelulose e com  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ , em géis de acrilamida ou agarose, quando se necessita de maior sensibilidade.

### Telas intensificadoras

Os raios gama, como os emitidos pelo  $^{125}\text{I}$ , e as partículas beta de alta energia, como as emitidas pelo  $^{32}\text{P}$ , têm alto poder de penetração, não sendo absorvidos eficientemente pelo filme de radiografias. Consequentemente, atravessam e ultrapassam o filme, de modo que a maior parte da energia emitida se perde, sem ser registrada. Para solucionar esse problema pode-se colocar o filme entre a amostra e uma tela intensificadora, constituída de uma substância fluorescente inorgânica de alta densidade. Essa tela absorve mais eficientemente a radiação que passa através do filme e a converte em luz azul ou ultravioleta, que é enviada de volta para o filme, havendo a formação de uma imagem fotográfica, que se sobrepõe à autorradiográfica. Essa conversão é utilizada rotineiramente na radiologia médica.

Do mesmo modo que na fluorografia, há necessidade de exposição a  $-70^{\circ}\text{C}$  e de pré-exposição do filme a um breve *flash* de luz, quando se detectam pequenas quantidades de radioatividade, em longos períodos de exposição, para superar a fase inicial da formação da imagem fotográfica pela luz, que é reversível. Embora as telas de intensificação aumentem muito a sensibilidade de detecção do  $^{32}\text{P}$  e dos emissores gama, há diminuição na resolução devido ao espalhamento das emissões primárias e secundárias.

Entre as telas intensificadoras disponíveis, a de tungstato de cálcio é a mais utilizada, pois fornece maior resolução e menor reação de fundo na detecção de radioisótopos. Telas que contêm fluorocloreto de bário ativado com európio ou oxissulfeto de lantânio, gadolínio ou ítrio ativado com térbio podem ser mais sensíveis, porém fornecem menor resolução e maior reação de fundo devido à necessidade da exposição a  $-70^{\circ}\text{C}$  e à pré-exposição do filme.

Esse método é recomendado com  $^{32}\text{P}$  e os emissores gama, em qualquer tipo de amostra plana, quando se necessita de maior sensibilidade, e não tem efeito na detecção de emissões de menor energia, como no caso de  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ .

## ► Técnicas imunoenzimáticas

As técnicas imunoenzimáticas têm base na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas e permitem a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. Vários métodos imunoenzimáticos foram desenvolvidos:

- Para a localização de constituintes celulares
- Para a medida de pequenas quantidades de antígenos, haptenos e anticorpos
- Para a detecção de imunoprecipitados.

Nessas técnicas, um dos fatores mais importantes é a eficiência do conjugado empregado e, consequentemente, a escolha de três componentes: anticorpo ou antígeno, enzima e processo de conjugação, cujas características, por sua vez, variam de acordo com a técnica empregada.

### ■ Immunoperoxidase

A técnica de marcação de anticorpos com enzimas foi introduzida por Avrameas e Uriel e por Nakane e Pierce, em 1966, para detectar e localizar antígenos celulares empregando microscopia óptica comum. Como a enzima utilizada foi a peroxidase, a técnica ficou conhecida como imunoperoxidase.

As técnicas para localizar constituintes celulares seguem o mesmo princípio da imunofluorescência, com a diferença de que, em vez do fluorocromo, emprega-se a enzima, que tem maior capacidade de amplificação. A enzima converte o componente cromógeno (substrato + doador de hidrogênio) em um produto insolúvel que precipita no sítio da reação. Esses precipitados podem ser visíveis ao microscópio óptico comum e, adicionando-se tetróxido de ósmio, ao microscópio eletrônico. Além da peroxidase, outras enzimas, como a fosfatase alcalina e a glicose oxidase, podem ser empregadas na localização de antígenos. A peroxidase é a enzima de escolha porque a coloração é de fácil realização e fornece resultados satisfatórios e reprodutíveis; além disso, seu baixo peso molecular permite que o conjugado penetre com maior facilidade no interior de células fixadas, definindo melhor as estruturas. Dependendo do cromógeno utilizado, podem ser obtidos produtos de reação com colorações diferentes, o que permite a detecção simultânea de dois ou mais constituintes celulares.

Uma variação do teste é a técnica PAP (peroxidase-antiperoxidase), que compreende três estágios. O anticorpo específico, obtido em coelho, reage com o antígeno da lâmina. A seguir, coloca-se uma anti-imunoglobulina de coelho obtida em cabra. Finalmente, adiciona-se um complexo solúvel que consiste em peroxidase combinada com antiperoxidase, obtida em coelho. Esse complexo se liga à anti-imunoglobulina de coelho já fixada ao primeiro anticorpo, incorporando a peroxidase ao sistema. Adiciona-se o cromógeno e obtém-se o precipitado marrom.

A técnica da imunoperoxidase pode ser utilizada na pesquisa de anticorpos, com o mesmo princípio utilizado na imunofluorescência indireta. Antígenos são fixados à lâmina e incubados com diluições do soro onde se quer pesquisar os anticorpos específicos. Após lavagem, incuba-se com uma anti-imunoglobulina marcada com a peroxidase. Depois, adiciona-se o substrato cromogênico, como a diaminobenzidina/ $\text{H}_2\text{O}_2$  que, sob a ação da enzima, forma um precipitado. Com relação à imunofluorescência,



a imunoperoxidase tem a vantagem de fornecer preparações duradouras e de não necessitar da microscopia de fluorescência.

O sistema de amplificação da avidina/estreptavidina-biotina pode ser utilizado na técnica da imunoperoxidase, em que a enzima é conjugada à avidina e o anticorpo, à biotina. Esse sistema tem sido utilizado em vários estudos de imunocitoquímica e imuno-histoquímica. Em tecidos que contêm altos níveis de biotina endógena, o que pode resultar em alto nível de coloração de fundo, é necessário bloquear a molécula endógena antes de adicionar os reagentes biotinilados.

## ▪ Enzimaimunoensaio

O enzimaimunoensaio é um método quantitativo em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada pela medida da atividade enzimática. Desempenha papel muito importante no laboratório clínico, pois, além de elevada sensibilidade, comparável à do radioimunoensaio, apresenta as vantagens de utilizar reagentes estáveis, estar livre das exigências de trabalhar com radioisótopos e poder ser adaptado tanto a testes simples quanto à automação. O ensaio pode ser empregado com uma variedade de sistemas de detecção, que vão de leituras visuais a fotométricas, com substratos coloridos, fluorescentes ou luminescentes, fato que tem contribuído para a multiplicação de seus métodos e aplicações.

Uma característica comum entre radioimunoensaio e enzimaimunoensaio é que ambos medem, diretamente, a interação entre o antígeno e o anticorpo, não dependendo de um segundo fenômeno como precipitação, aglutinação ou fixação de complemento. Este segundo fenômeno requer a formação de complexos antígeno-anticorpo maiores, o que diminui o seu limiar de sensibilidade.

Rubenstein, em 1972, classificou o enzimaimunoensaio em dois tipos: homogêneo e heterogêneo. Nos ensaios homogêneos, não é necessário separar os complexos antígeno-anticorpo e o antígeno e/ou o anticorpo livres, pois a interação antígeno-anticorpo modula a atividade da enzima. Nos ensaios heterogêneos a separação é necessária, pois a atividade da enzima não é alterada pela reação antígeno-anticorpo. Os ensaios homogêneos são mais utilizados para detectar haptenos e os heterogêneos, para detectar moléculas maiores.

Para ser utilizada em imunoensaio, a enzima deve preencher os seguintes requisitos: ter alta atividade específica, sendo o produto da reação enzimática estável, de fácil quantificação e com alto coeficiente de extinção molar, facilitando a detecção de pequenas quantidades de enzima; ser estável; ser facilmente obtida em forma purificada; ser facilmente conjugada a vários antígenos, anticorpos e haptenos, sem perda da sua atividade; ter preço acessível. Entre as enzimas, a mais empregada é a peroxidase, que, além desses requisitos, pode ser conjugada por vários processos e ser revelada por várias substâncias cromogênicas. Quando o antígeno tem atividade de peroxidase, a fosfatase alcalina é uma boa alternativa.

Nos ensaios heterogêneos, além da peroxidase, as enzimas mais utilizadas são fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, glicose oxidase, glucoamilase, anidrase carbônica e acetilcolinesterase. Nos ensaios homogêneos, são lisozima, malato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, ribonuclease A e  $\beta$ -galactosidase.

## ELISA

O termo ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) foi utilizado pela primeira vez por Engvall e Perlmann, em 1971, e identifica um ensaio heterogêneo, diferente dos métodos enzimáticos até então utilizados, que envolviam colorações imuno-histoquímicas pela técnica de imunoperoxidase. O conceito de enzimaimunoensaio heterogêneo foi apresentado por Miles e Hales, em 1968, mas o emprego de conjugados enzimáticos em imunoensaios foi relatado, independentemente, por Engvall e Perlmann (Suécia), com o termo ELISA, e por Van Weemen e Schuurs (Holanda), com o termo EIA (enzimaimunoensaio), em 1971. Esse teste foi desenvolvido, como uma alternativa ao radioimunoensaio, para detectar antígenos e anticorpos. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação das atividades enzimática e imunológica do anticorpo. A fase sólida pode ser constituída por partículas de agarose, poliacrilamida, dextrana, poliestireno etc. Placas plásticas são as mais difundidas, por permitirem a realização de múltiplos ensaios e automação. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados.

Especial atenção deve ser dada à fase sólida, cujas propriedades podem variar de acordo com a composição. Os materiais plásticos disponíveis para essa finalidade são poliestireno, polipropileno, policarbonato e polivinil. O poliestireno é o mais adequado para proteínas. É composto por uma longa cadeia de carbono com anéis de benzeno, o que o torna muito hidrofóbico. Há placas de poliestireno com alta, média e baixa capacidade de ligação de proteínas.

Proteínas e outras biomoléculas ligam-se às placas por vários mecanismos. A adsorção passiva consiste em interações hidrofóbicas (média ligação) ou interações hidrofóbico-iônicas (alta ligação), entre os resíduos apolares das proteínas e a superfície da placa, embora forças eletrostáticas também possam contribuir. Em placas que têm a superfície modificada por grupos amina ou carboxil, a ligação à biomolécula se faz covalentemente.

Placas de média capacidade de ligação são recomendadas para a imobilização de moléculas grandes, como anticorpos ou antígenos > 20 kDa, que apresentam grandes áreas hidrofóbicas capazes de reagir com a placa. A capacidade de ligação dessas placas é de 100 a 200 ng IgG/cm<sup>2</sup>.

Placas de alta capacidade de ligação são modificadas por radiação que incorpora grupos carboxílicos ao anel benzênico, permitindo interações hidrofóbicas e iônicas com os grupos com carga positiva das biomoléculas. São indicadas para ligação de biomoléculas de tamanho médio a grande (> 10 kDa) com carga positiva com ou sem grupos hidrofóbicos. A capacidade de ligação é de 400 a 500 ng IgG/cm<sup>2</sup>.

Em casos especiais, podem ser necessárias placas pré-ativadas. Por exemplo, placas pré-revestidas com proteína A ou proteína G para a sensibilização com anticorpos; placas pré-revestidas com estreptavidina para amostras ou anticorpos biotinilados; placas revestidas com níquel ou cobre para proteína com cauda de histidina ou anticorpos IgG que têm uma sequência rica em histidina em seu domínio Fc; placas modificadas pela substituição do anel benzeno por grupos amina carregados positivamente para a ligação iônica de moléculas pequenas com carga negativa por meio dos grupos funcionais amina, carboxil ou tiol.



As placas de poliestireno podem ser modificadas introduzindo-se grupos funcionais que permitem a imobilização covalente de biomoléculas. Assim, há placas ativadas com anidrido maleico ou maleimida para a ligação covalente de moléculas por meio de aminas ou tióis; placas ativadas com N-oxissuccinimida para a ligação covalente de grupos amina; placas ativadas com hidrazida para a ligação covalente de carboidratos ativados por periodato. Para escolher uma dessas placas, é necessário conhecer a estrutura da molécula que será imobilizada na fase sólida e que esse processo não interfira com a atividade imunológica ou enzimática da molécula.

As placas podem ser de fundo plano, arredondado ou plano com cantos chanfrados (*easy wash*). As placas de fundo plano são mais adequadas para a leitura colorimétrica, pois possibilitam alta transmissão óptica e baixo *background*, embora possa haver retenção de líquido nos cantos; nas de fundo arredondado não há retenção de líquido, mas são menos adequadas para a leitura colorimétrica. As placas chanfradas são uma alternativa, embora seu uso seja menos difundido. As placas claras feitas de poliestireno puro são as mais indicadas devido às características de ligação e são ideais para leituras colorimétricas.

Embora algumas moléculas necessitem de condições especiais ou pré-tratamento antes de serem imobilizadas, o método mais utilizado de sensibilização de placas emprega concentrações de proteínas entre 2 e 10 µg/ml diluídas em solução salina tamponada por fosfatos (PBS), pH 7,4, ou em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. A solução alcalina auxilia na solubilização de várias proteínas e peptídios, e a maioria das proteínas se liga mais fortemente às placas em condições alcalinas. O PBS é recomendado quando as placas forem secas para utilização posterior, pois o fosfato estrutura as moléculas de água ao redor das moléculas, diminuindo a desnaturação. A incubação das placas deve ser feita *overnight* (16 h) a 4°C, para permitir o equilíbrio entre as moléculas livres e as ligadas.

O grau de pureza do antígeno ou do anticorpo da fase sólida é muito importante, pois qualquer material heterólogo competirá pelo espaço na placa. Para a pesquisa de antígeno, o anticorpo utilizado na sensibilização deve ter alta afinidade e curva dose-resposta com grande inclinação. Para a pesquisa de anticorpos, o antígeno deve estar livre de impurezas, podendo-se utilizar antígenos purificados por cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais, peptídios sintéticos ou antígenos recombinantes.

Após a sensibilização da placa com o antígeno ou o anticorpo, todos os sítios reativos da placa devem ser bloqueados com uma alta concentração de proteína, como leite desnatado, soroalbumina bovina, gelatina, caseína e soro fetal bovino. Essa solução de bloqueio também pode ser utilizada como diluente nas fases subsequentes do teste para diminuir o *background* e estabilizar as moléculas ligadas à placa. As placas sensibilizadas podem ser utilizadas imediatamente ou secas e conservadas a 4°C para serem utilizadas posteriormente, dependendo da estabilidade da proteína ligada.

Quanto à amostra, é importante que seja ensaiada na faixa de concentração em que a curva dose-resposta do teste ELISA tenha grande inclinação, ou seja, na região em que pouca variação na concentração resulta em grande aumento na densidade óptica. Para tanto, é necessário diluir a amostra. A adsorção não específica de componentes da amostra na placa pode ser reduzida incluindo-se um detergente não iônico, como o Tween 20, e/ou proteína (leite desnatado, gelatina, soroalbumina bovina, caseína, soro fetal bovino etc.) no diluente da amostra. Na pesquisa de anticorpos, diluições da

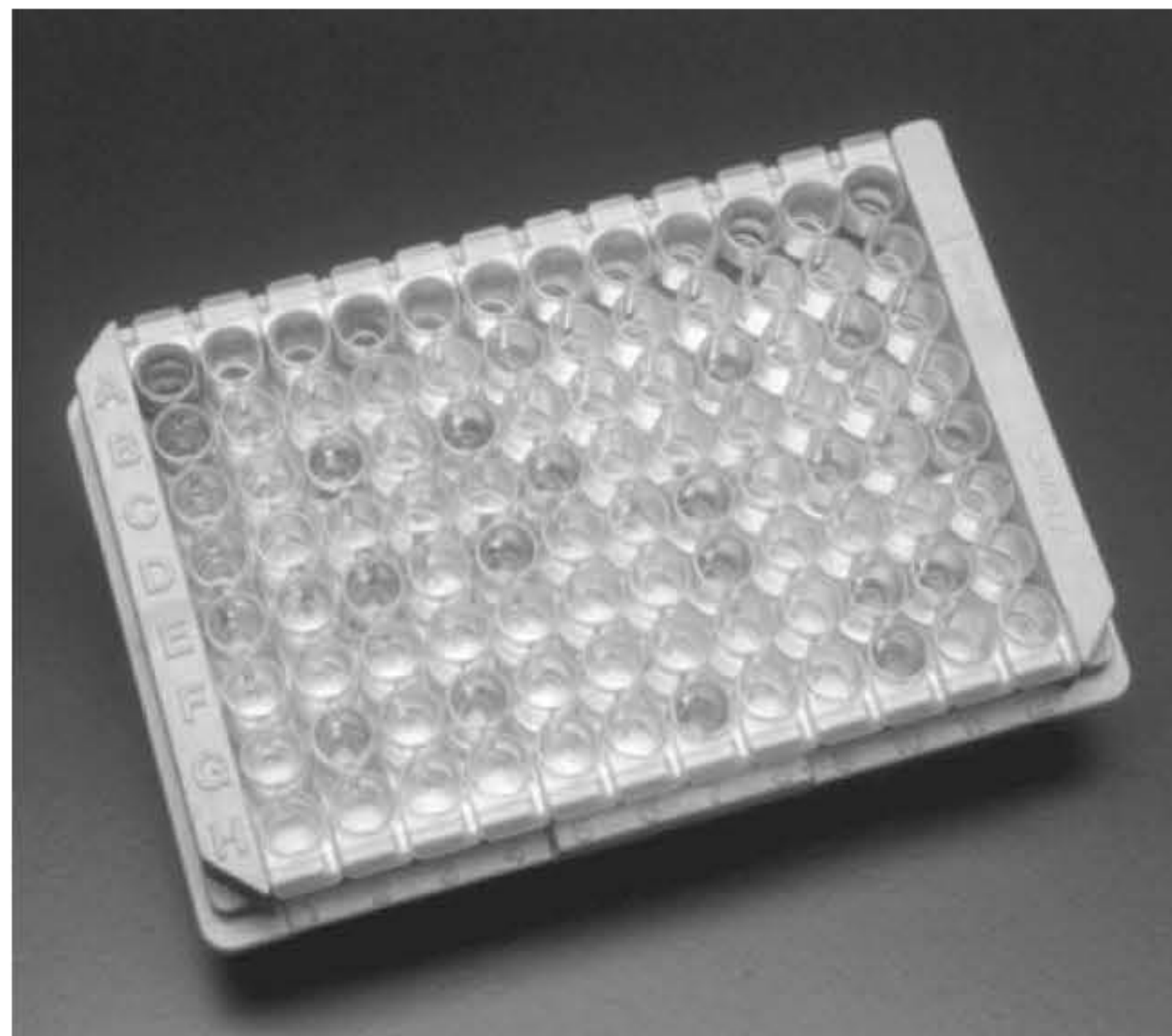
amostra da ordem de 100 vezes ou mais auxiliam a diminuir as reações inespecíficas; o emprego de uma única diluição da amostra pode levar a resultados falso-negativos ou subestimados quando os anticorpos são de baixa afinidade.

As lavagens entre os períodos de incubação do teste são feitas, geralmente, com tampão fosfato contendo Tween 20 a 0,05%, que promove a dissociação das ligações mais fracas e age como um bloqueador hidrofóbico, bloqueando sítios na superfície da placa que podem ficar livres devido à lavagem. Para promover a dissociação de anticorpos de baixa afixidez, pode-se realizar a lavagem com solução de ureia ou de aminas básicas.

Os conjugados devem ser preparados com anticorpos de alta afinidade e maximamente purificados. Melhores resultados são obtidos com anticorpos purificados por cromatografia de afinidade ou com anticorpos monoclonais, mas anticorpos produzidos em animais ou hibridomas diferentes, embora reagentes contra o mesmo epítipo, podem variar. O método de conjugação, os diluentes e as condições de armazenamento podem influenciar o desempenho do conjugado.

As enzimas mais utilizadas no teste ELISA são a peroxidase e a fosfatase alcalina. Cada uma tem as suas vantagens e desvantagens. Ambas são estáveis, podem ser estocadas a 4°C por mais de 6 meses e são relativamente baratas. A principal vantagem da peroxidase é ser uma molécula pequena (40 kDa), e, por isso, raramente causa problemas de impedimento estérico. A principal desvantagem é ser incompatível com preservantes como a azida sódica. A fosfatase alcalina é mais estável do que a peroxidase, porém é uma molécula maior (140 kDa) e um pouco mais cara. Entretanto, sua principal desvantagem é ser inativada por agentes quelantes, pH ácido e fosfatos inorgânicos.

Para a revelação da reação são utilizados substratos cromogênicos que, por sua ação enzimática, dão origem a produtos solúveis coloridos (Figura 2.13). Para a peroxidase, o substrato é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-aminossalicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB). A peroxidase reduz a  $H_2O_2$ , o que leva à oxidação do segundo substrato e dá origem a um produto de reação solúvel e colorido. A escolha do cromógeno, embora dependa da prefe-



**Figura 2.13** Placa de ELISA em que se empregou OPD/ $H_2O_2$  na revelação da reação.



rência do laboratório, deve levar em consideração vários fatores, como sensibilidade, reação de fundo, estabilidade do composto, toxicidade e custo. ABTS é menos sensível que OPD e TMB, o que pode ser uma vantagem no caso de ensaios com elevada coloração de fundo. TMB é muito sensível e pode originar elevada coloração de fundo quando se utiliza muito antígeno ou anticorpo. A concentração ótima do substrato ( $H_2O_2$ ) é o fator mais importante no desenvolvimento da cor e depende do cromógeno empregado e da fase sólida, devendo ser estabelecida preliminarmente. Após o desenvolvimento da coloração, sua determinação pode ser feita visualmente, para resultados qualitativos, ou medindo-se a densidade óptica da solução, espectrofotometricamente. Este é o método de escolha, e há vários tipos de fotômetros multicanal, específicos para a leitura de placas de ELISA. Variações diárias nas condições do teste tornam necessária a correção dos valores das amostras ensaiadas com relação a amostras de referência.

O objetivo do ensaio é a quantificação ou verificação da presença de um antígeno ou anticorpo. Os vários métodos de expressão dos resultados do teste se enquadram em duas categorias: quantificação da concentração da amostra em análise (geralmente para antígenos ou haptenos) ou relato dos valores da absorbância obtida ou outra unidade arbitrária (geralmente para anticorpos). No caso de antígenos bem definidos, é possível obter as concentrações em mg/ml, sendo necessária uma amostra de referência para construir uma curva dose-resposta para calibração (concentração do padrão *versus* absorbância). Na pesquisa de anticorpos a quantificação é mais complexa, pois, além de serem heterogêneos quanto à sua afinidade e propriedades físico-químicas, são, geralmente, ensaiados em uma faixa de concentração mais ampla do que a dos antígenos. Além disso, a afinidade dos anticorpos varia com a concentração, sendo maior em amostras mais diluídas. Essas diferenças devem ser consideradas ao se expressar os resultados, mas, independentemente do método escolhido para relatá-los, é necessário determinar o limiar de reatividade ou *cut-off*. Valores acima do limiar de reatividade são considerados positivos. Vários métodos podem ser utilizados para expressar os resultados obtidos no teste ELISA:

- **Titulação simples:** após diluições em série da amostra, determina-se o título com relação ao limiar de reatividade
- **Método da dose efetiva:** compara a curva dose-resposta da amostra com a de um soro positivo de referência. Este método é mais reprodutível do que o anterior porque as leituras são feitas no ponto de inflexão e não na cauda da curva, como na titulação simples
- **Absorbância:** necessita de uma só diluição da amostra
- **Curva de unidade padrão:** os valores da absorbância são transformados em unidades que fornecem uma escala contínua, proporcional à quantidade de anticorpos. Considerando-se que as curvas dose-resposta para vários soros sejam paralelas, é necessária apenas uma diluição da amostra
- **Métodos proporcionais:** empregam a razão entre os valores da amostra e um valor médio de um grupo de amostras não reagentes. Razões acima de duas ou três vezes são consideradas positivas
- **Múltiplo da atividade normal:** considera-se a metade final das curvas dose-resposta e calcula-se o expoente da curva parabólica dessa parte. Neste modelo, as curvas dose-resposta são consideradas paralelas. Apresenta as vantagens da proporcionalidade, da comparação direta com o soro negativo e de necessitar uma única diluição

- **Determinação do limiar de reatividade a partir do cálculo da média das absorbâncias de amostras de indivíduos normais acrescida de 2 ou 3 desvios padrões:** amostras com absorbância acima desse valor são consideradas reagentes. Este método requer uma única diluição da amostra, porém, do ponto de vista estatístico, pode não ser correto aplicar a média e o desvio padrão a dados que frequentemente não têm distribuição normal
- **Soro limiar de reatividade:** um *pool* de soros padrão positivos diluído em *pool* de soros normais é titulado, escolhendo-se uma diluição que forneça densidade óptica próxima à considerada limiar de reatividade. Este método utiliza uma única diluição da amostra.

Devido às características de elevada sensibilidade e especificidade, bem como de rapidez, baixo custo, simplicidade técnica, versatilidade, objetividade de leitura e possibilidade de adaptação a diferentes graus de automação, o teste ELISA é empregado na detecção de antígenos ou anticorpos em um número muito grande de sistemas. A extensa utilização dos testes ELISA deve-se também à grande disponibilidade de anticorpos monoclonais e ao desenvolvimento de antígenos recombinantes específicos para um grande número de doenças autoimunes e infecciosas. O teste ELISA substituiu o radioensaio, pois, além de ter sensibilidade comparável, não apresenta os problemas decorrentes da utilização de radioisótopos. Também vem substituindo várias outras técnicas, como a imunofluorescência e a aglutinação.

A seguir, são descritos os métodos empregados para a pesquisa de anticorpos e antígenos pelo teste ELISA. Por se tratar de um ensaio heterogêneo, após cada etapa, como sensibilização, incubação com amostra e com o conjugado, as cavidades das placas são lavadas para efetuar a remoção do material não ligado à fase sólida.

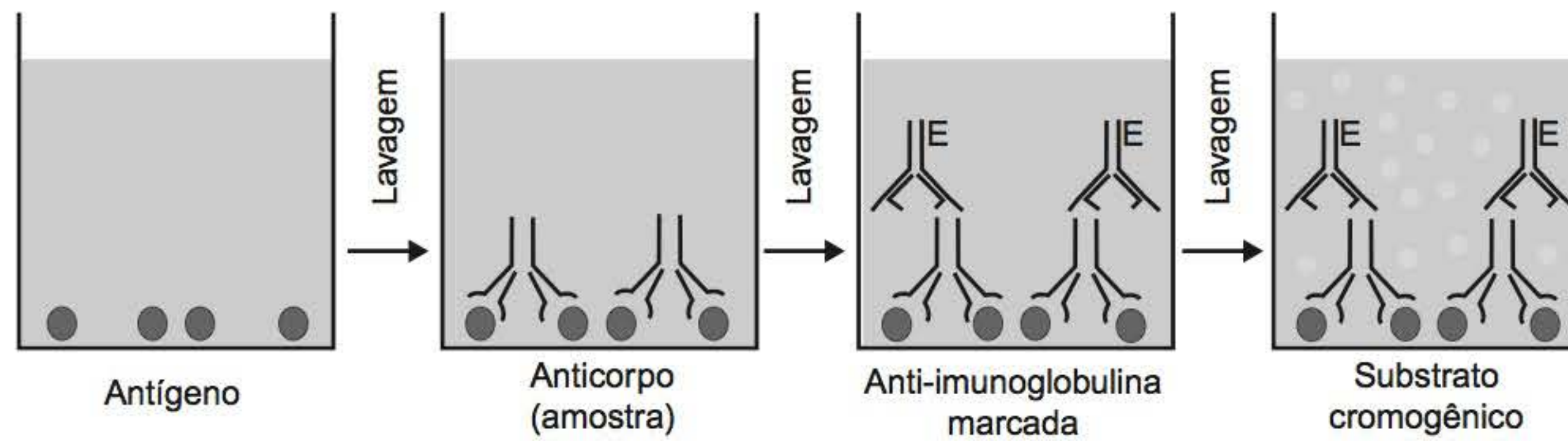
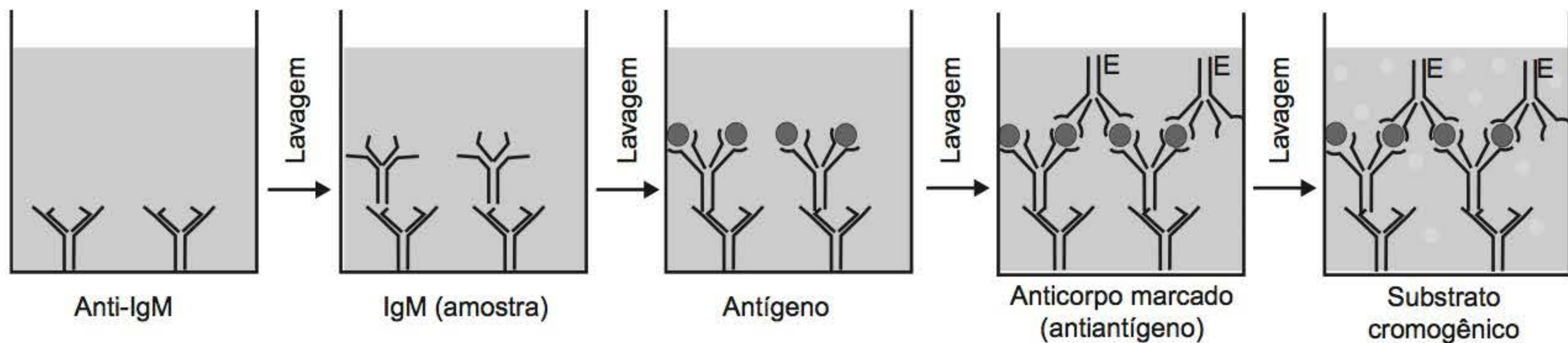
### Ensaio para anticorpos

► **Método indireto.** O método indireto tem sido amplamente empregado na pesquisa de anticorpos e apresenta como vantagens a possibilidade de utilizar um único conjugado, em diferentes sistemas, e conjugado classe-específico na determinação de anticorpos de diferentes classes.

No método básico (Figura 2.14), placas plásticas são sensibilizadas com o antígeno que, após bloqueio, reage com os anticorpos da amostra. O conjugado anti-imunoglobulina humana reage com o anticorpo capturado pelo antígeno e a reação é revelada com a solução cromógena. A reação é interrompida, e a intensidade de cor é estimada a olho nu ou fotometricamente. O grau de degradação do substrato, geralmente indicado pela intensidade de cor da solução, é proporcional à concentração de anticorpo. Várias modificações podem ser feitas no método básico:

- Se o antígeno não for suficientemente puro, um anticorpo específico pode ser ligado à fase sólida, seguido pelo antígeno bruto. Neste caso, é necessário que o anticorpo que sensibiliza a fase sólida não reaja com o conjugado
- Após se colocar a amostra, em vez de fazer a incubação com o conjugado, pode-se colocar anti-imunoglobulina não marcada e, em seguida, conjugado anti-imunoglobulina. Essa técnica é empregada na pesquisa de anticorpos antissubclasses. No caso de IgG1, por exemplo, após a incubação com a amostra, coloca-se um monoclonal anti-IgG1 e, em seguida, um conjugado anticamundongo



**Método indireto****Método de captura para IgM**

**Figura 2.14** ELISA para a pesquisa de anticorpos. Esquema do método indireto e de captura para IgM.

- Em vez do conjugado enzimático com antiglobulina, pode-se utilizar proteína A (que se liga à porção Fc de IgG com grande afinidade) marcada com enzima.

► **Método de captura para anticorpos IgM.** Na detecção de IgM pelo método indireto podem ocorrer falsos resultados positivos devido à presença simultânea de anticorpo IgG e fator reumatoide (anticorpo IgM anti-IgG), que pode reagir com o conjugado anti-IgM. Podem ocorrer falsos resultados negativos se houver excesso de IgG, geralmente de maior afinidade, que compete pelo antígeno imobilizado. Esses problemas podem ser solucionados em parte absorvendo-se os soros com anti-IgG para remover os anticorpos IgG, ou com IgG agregada pelo calor para remover o fator reumatoide. Uma alternativa é o teste de captura de IgM (Figura 2.14).

A fase sólida é sensibilizada com anti-IgM específico para a região Fc. Os soros em teste são incubados, havendo a captura de qualquer IgM da amostra. A seguir, incuba-se com antígeno marcado ou antígeno não marcado, seguido de anticorpo específico marcado. Essa técnica não necessita de antígeno purificado.

O teste de captura é indicado para anticorpos IgM, pois, durante a fase aguda das infecções, a maioria do IgM presente é específica. Porém, para anticorpos IgG, o teste de captura não é conveniente porque a quantidade de anticorpo IgG específico pode representar até menos de 10% do total de IgG.

**Ensaio para antígenos**

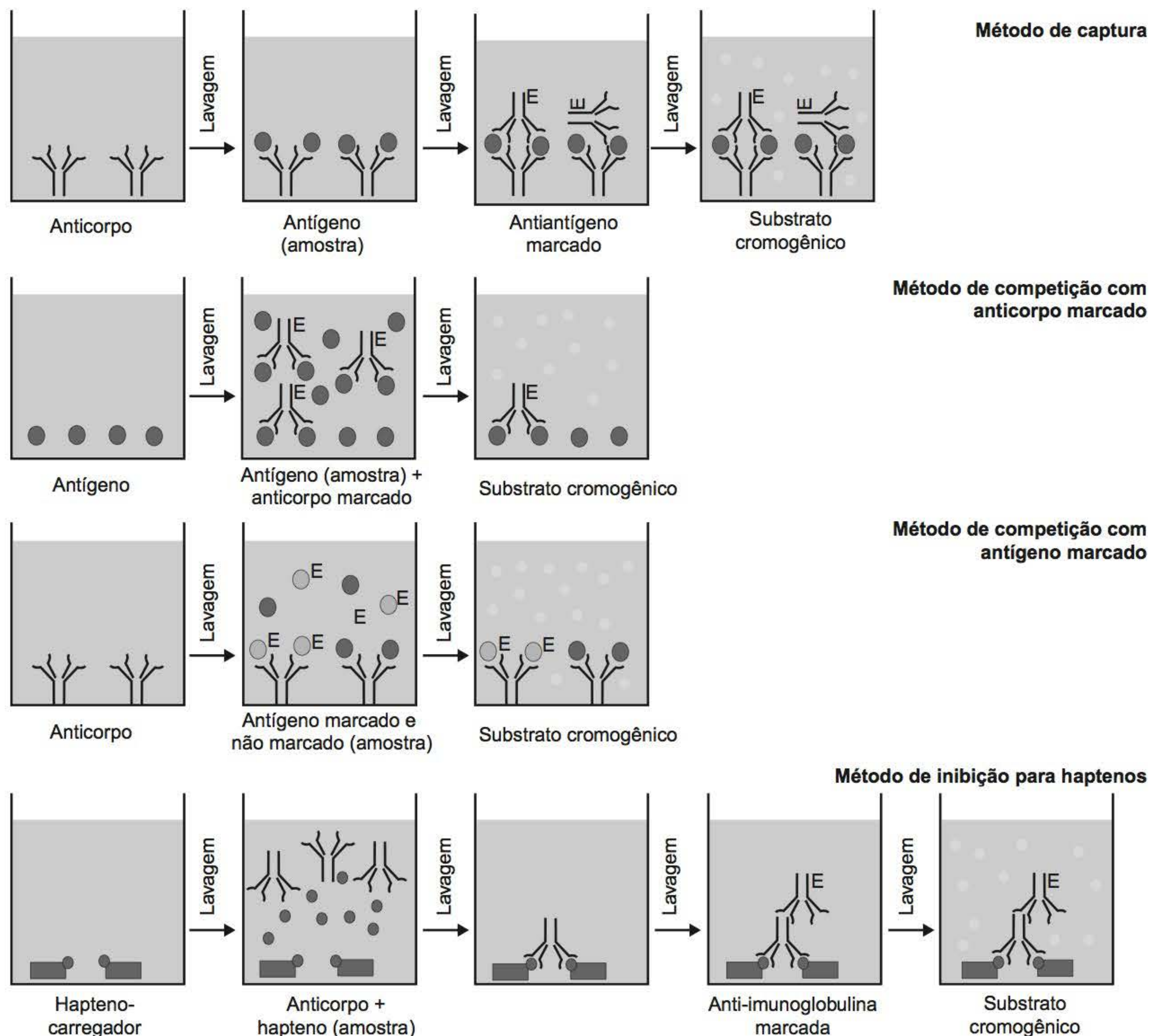
► **Método de captura.** O método imunoenzimométrico (Figura 2.15) ou de captura, com excesso de anticorpo marcado, é o mais utilizado para antígenos polivalentes, pois apresenta sensibilidade 2 a 5 vezes maior do que os métodos em que o antígeno é ligado à fase sólida. Este método é semelhante ao imunorradiométrico de dois sítios ou duplo anticorpo. Também é conhecido como ELISA de “sanduíche”. A fase sólida é sensibilizada com anticorpo específico. A amostra em teste, na qual será pesquisado o antígeno, é incubada com

a fase sólida e, a seguir, é incubada com o excesso de anticorpo específico marcado com enzima. A reação é revelada pela adição do substrato. A taxa de degradação é proporcional à concentração do antígeno.

Nos sistemas ELISA de “sanduíche”, podem ser empregados anticorpos monoclonais ou policlonais tanto para a captura quanto para a detecção. Os anticorpos monoclonais permitem a detecção de pequenas diferenças entre os antígenos. Geralmente, emprega-se anticorpo policlonal para a captura da maior quantidade de antígeno e o monoclonal para a detecção mais específica. É importante que os anticorpos de captura e detecção reconheçam epítomos diferentes e não sobrepostos, pois o uso do mesmo anticorpo na captura e detecção diminui a sensibilidade do ensaio. Várias modificações são possíveis:

- A placa pode ser sensibilizada com anticorpo monoclonal, com especificidade para um determinado epítipo do antígeno, e o conjugado pode ser preparado com a marcação de um monoclonal, com especificidade para outro epítipo do mesmo antígeno. A principal vantagem deste método é que permite incubar a amostra com antígeno e o conjugado ao mesmo tempo, tornando o ensaio mais rápido
- Se o anticorpo ligado à placa é de uma espécie (carneiro) e um anticorpo não marcado é de uma segunda espécie (coelho), pode-se introduzir um passo extra em que um conjugado enzimático antioelho é usado. Embora este procedimento envolva um passo a mais, só necessita um reagente antiespécie (anticoelho), e esse reagente pode ser usado com antissoro de qualquer especificidade produzido naquela espécie. Este procedimento é importante se os antissoros tiverem títulos baixos e se houver vários antígenos a serem detectados
- A sensibilização da placa pode ser feita com fragmento  $F(ab)_2$  do anticorpo. A amostra é então adicionada, seguida de antissoro não marcado. No lugar do conjugado antiespécie, pode-se utilizar conjugado com proteína A





**Figura 2.15** ELISA para a pesquisa de antígenos. Esquema dos métodos de captura, competição com anticorpo marcado, competição com antígeno marcado e inibição para haptenos.

■ O sistema avidina/estreptavidina-biotina tem sido empregado para aumentar a sensibilidade do ensaio. O método de captura pode ser efetuado do mesmo modo até a incubação da amostra, sendo então adicionado anticorpo marcado com biotina e, em seguida, avidina/estreptavidina marcada com enzima. Alternativamente, o mesmo procedimento pode ser efetuado com anticorpo marcado com biotina, seguido de avidina/estreptavidina e de biotina marcada com enzima.

► **Método de competição com antígeno marcado.** As placas são sensibilizadas com anticorpo específico e incubadas com o conjugado antígeno-enzima na presença da amostra em que se quer pesquisar o antígeno ou um padrão de antígeno. Após a obtenção do equilíbrio da reação antígeno-anticorpo, incubase o preparado com uma solução do substrato da enzima. A reação enzimática é interrompida e faz-se a leitura espectrofotométrica. Há uma relação inversamente proporcional entre a concentração de antígeno, na amostra ou no padrão, e as densidades ópticas obtidas. Esse método é análogo ao radioimunoensaio. A reação está esquematizada na Figura 2.15.

► **Método de competição com anticorpo marcado.** Nessa técnica (Figura 2.15), o antígeno é ligado à placa e a ligação do anticorpo marcado é, competitivamente, inibida pela adição de antígeno padrão ou da amostra. As demais etapas são semelhantes às do método com antígeno marcado. As densidades ópticas obtidas são inversamente proporcionais à concentração do antígeno na amostra ou no padrão.

► **Método de inibição para haptenos.** As placas sensibilizadas com hapteno-carregador (Figura 2.15) são incubadas com a amostra em que se quer pesquisar o hapteno, misturada com anticorpo produzido pela inoculação do hapteno-carregador. Após a lavagem, adiciona-se anticorpo anti-imunoglobulina marcado com enzima. Ao mesmo tempo, executa-se um ensaio de referência com uma amostra sem hapteno. A diferença entre a absorbância na amostra e na referência reflete o nível de hapteno na amostra. Alternativamente, pode-se realizar um ensaio clássico de competição em que o hapteno é marcado com a enzima.



### Enzimaimunoensaio homogêneo

Rubenstein *et al.*, em 1972, descreveram um sistema homogêneo do enzimaimunoensaio em que a atividade da enzima conjugada a um ligante diminuía quando o anticorpo se complexava ao ligante. Atualmente há vários tipos de enzimaimunoensaios homogêneos, tanto quantitativos como semiquantitativos, cuja característica é a modulação da atividade da enzima na presença do substrato, pela interação antígeno-anticorpo, refletindo o grau de reação. Embora o ensaio homogêneo necessite de reagentes complexos, dispensa a separação em fases, é rápido, de fácil execução e bem adaptável a diferentes graus de automação. É indicado para medir fármacos e outros haptenos, mas pode apresentar problemas para a medida de proteína devido ao impedimento estérico.

### Immunodot

Este teste, também conhecido como *dot-ELISA*, *dot-immunobinding assay*, *dot-blotting assay* e *dot-blot ELISA*, utiliza uma membrana de nitrocelulose em que pequenas quantidades de amostra são aplicadas como gotas. Foi desenvolvido por Hawkes *et al.*, em 1982, que verificaram que o teste poderia ser aplicado a uma série de antígenos. Os autores testaram e obtiveram excelentes resultados com proteínas solúveis, ácidos nucleicos, membranas, organelas, fungos, protozoários, bactérias e vírus.

As membranas de nitrocelulose adsorvem proteínas com grande eficiência (praticamente 100%), sendo muito úteis, como fase sólida, em ensaios qualitativos, quando o volume da amostra é muito pequeno (menos de 1 µl), ou com antígenos solubilizados em detergentes iônicos. Devido a essa elevada capacidade de adsorção de proteínas pela membrana, volumes de 0,1 a 1 µl, contendo 100 a 400 pg de imunorreagente, são suficientes.

O *dot-ELISA* tem sido empregado na detecção de anticorpos em vários sistemas e na caracterização de anticorpos monoclonais devido à sua simplicidade, rapidez e sensibilidade. A membrana que contém o antígeno é bloqueada com proteínas e detergente (geralmente, leite desnatado e Tween 20) para evitar ligações inespecíficas, e a amostra é incubada. Sucedem-se a lavagem, a incubação com conjugado anti-imunoglobulina marcada, a lavagem e a adição de substrato para o desenvolvimento de cor.

As enzimas mais utilizadas são peroxidase, fosfatase alcalina e glicose oxidase. No caso da peroxidase, os substratos empregados são diaminobenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4-cloro-1-naftol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, sob a ação da enzima, dão origem a um precipitado colorido. Além dos substratos coloridos, outros sistemas de detecção podem ser empregados com substratos fluorescentes ou luminescentes, fato que tem contribuído para uma ampla aplicação em diferentes sistemas.

O *immunodot* também pode ser realizado utilizando-se conjugados marcados com radioisótopos, sendo as bandas detectadas pela autorradiografia.

### Western blotting

Um dos métodos mais utilizados para identificar proteínas e glicoproteínas específicas, reconhecidas por anticorpos, tem sido o *immunoblotting*, *western blot* ou *western blotting*, para diferenciá-lo do *Southern* e *Northern blotting*, que se referem à identificação de ácidos nucleicos. É um método em que as proteínas são separadas, de acordo com seu tamanho,

por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e, após a separação, são transferidas, eletroforéticamente, do gel para uma membrana de nitrocelulose, ou outra equivalente, onde ficam imobilizadas, como uma réplica do padrão de bandas do gel. Após o bloqueio da membrana, a identificação imunológica das frações separadas e transferidas é feita imergindo-se as tiras de nitrocelulose em solução contendo os anticorpos específicos para as frações. Os anticorpos se ligam aos antígenos imobilizados e são revelados ao se colocar a membrana em solução contendo anti-imunoglobulina marcada com a enzima. Para a visualização adiciona-se o cromógeno que, sob a ação da enzima, dá origem a um precipitado colorido (Figura 2.16).

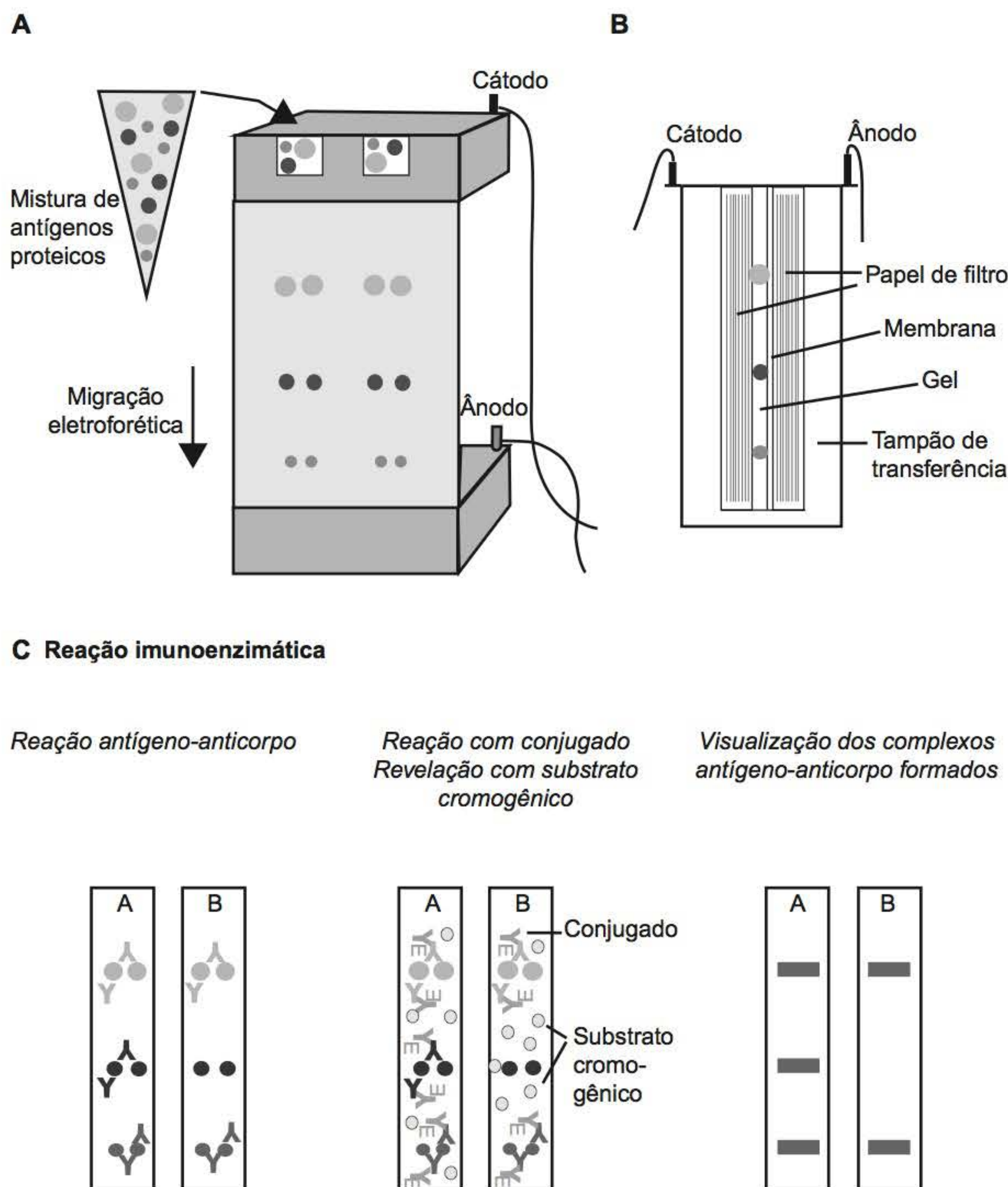
O *western blotting* combina a seletividade da eletroforese em gel à especificidade do imunoensaio, permitindo que proteínas individuais, em misturas complexas, sejam detectadas e analisadas. É um método qualitativo; o aparecimento de uma banda em um *blot* indica a presença de um antígeno na mistura que foi submetida à eletroforese ou de um anticorpo na amostra ensaiada na membrana.

Weber e Osborn (1969) e Laemmli (1970) utilizaram a técnica de SDS-PAGE para determinar a mobilidade de várias proteínas e verificaram que essa mobilidade era uma função linear dos logaritmos de seus pesos moleculares. O SDS, um detergente aniônico, liga-se às regiões hidrofóbicas das proteínas em quantidade proporcional ao seu peso molecular e confere-lhes carga negativa, de modo que elas migram para o polo positivo e são facilmente separadas por eletroforese de acordo com sua carga total. O SDS também provoca a ruptura de pontes dissulfeto, promovendo o dobramento das subunidades em forma de hastes semirrígidas de tamanho proporcional ao peso molecular. Assim, a migração dessas proteínas em um campo elétrico é função da sua massa e depende do tamanho dos poros do gel, que é proporcional à concentração de acrilamida-poliacrilamida: as proteínas menores migram mais rápido. A SDS-PAGE pode ser empregada para estimar o peso molecular de uma proteína, comparando-se a sua distância de migração à de padrões de peso molecular em linhas paralelas de um mesmo gel; para estimar o grau de pureza de uma amostra etc. Glicoproteínas com alto teor de carboidratos têm uma mobilidade menor do que se esperaria pelo seu peso molecular, devido à ligação a uma menor quantidade de SDS quando comparada a outras proteínas de igual massa.

O preparo da amostra para ser submetida à SDS-PAGE é uma das etapas mais importantes para a obtenção de resultados satisfatórios ao final do processo. Esse preparo visa à solubilização das proteínas da amostra. O processo de solubilização envolve certo grau de desnaturação das proteínas, podendo-se empregar ureia, detergentes não iônicos (Triton X-100, Nonidet P-40), detergentes aniônicos (SDS, desoxicolato de sódio) ou agentes redutores de pontes dissulfeto (β-mercaptoetanol, ditioneitol). O emprego de um desses agentes ou de combinações depende das propriedades físico-químicas das proteínas em análise e dos objetivos do estudo.

Para a transferência as membranas de nitrocelulose (celulose esterificada com ácido nítrico) são as mais utilizadas, pois têm alta capacidade de ligação a proteínas, principalmente por interações hidrofóbicas, embora a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias de aminoácidos e o grupo nitro da membrana possa estar envolvida. Essa adsorção de proteínas é instantânea, quase irreversível e quantitativa em uma ampla faixa de concentração de proteínas, 80 a 250 µg/cm<sup>2</sup>, dependendo da proteína. Alternativamente, outros tipos de mem-





**Figura 2.16** Western blotting. **A.** Separação das proteínas, na presença de SDS, de acordo com seu tamanho, por eletroforese em gel de poliacrilamida. **B.** Transferência das frações proteicas separadas, do gel para a membrana de nitrocelulose. **C.** Reação imunoenzimática para a identificação das frações separadas (antígenos) ou pesquisa de anticorpos em amostras. Exemplo de amostra com anticorpos contra as três frações do antígeno (A) e contra duas frações do antígeno (B).

branas, como, por exemplo, membranas de náilon carregadas positivamente ou membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), podem ser empregadas em casos em que a nitrocelulose não tem bom desempenho. O PVDF é um polímero do tipo Teflon com o qual as proteínas interagem não covalentemente, por meio de interações dipolares e hidrofóbicas, com força de ligação seis vezes maior que a da nitrocelulose. As membranas de PVDF têm sido muito empregadas devido à sua resistência a condições químicas drásticas, em que a nitrocelulose se dissolveria. Quanto à capacidade de reter proteínas, nas membranas de náilon é de 150 a 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e nas de PVDF é de aproximadamente 170  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Entre os vários métodos que têm sido empregados para a transferência das proteínas de géis para membranas, o mais eficiente é o eletroforético, que reproduz uma réplica fiel na membrana mantendo a resolução do gel. Há dois tipos principais de aparelhos para transferência: cuba com tampão e

sistema semiseco. As cubas de transferência são de plástico e têm um dispositivo que mantém a membrana em contato direto com o gel, que é colocado transversalmente ao campo elétrico e submerso no tampão condutor. Geralmente, é necessário refrigerar o sistema. No sistema semiseco o gel e a membrana ficam, horizontalmente, entre dois pedaços de papel de filtro umedecidos em tampão, em contato direto com dois eletrodos, que são placas condutoras que devem ter, no mínimo, o mesmo tamanho do gel para que forneçam um campo elétrico homogêneo. O termo semiseco se refere à limitada quantidade de tampão do papel de filtro. Ambos os métodos têm vantagens e desvantagens. O emprego das cubas permite melhor controle da temperatura devido ao grande volume de tampão da cuba, que ajuda a dissipar o calor gerado, sendo a transferência mais eficiente, principalmente para géis grandes. No caso de minigéis de acrilamida-poliacrilamida, o sistema semiseco apresenta bom desempenho, é de fácil manuseio,



permite transferência rápida e consome pouco tampão. Além disso, podem-se empregar tampões diferentes no cátodo e no ânodo para melhorar a transferência. A proximidade entre os eletrodos fornece alto gradiente com pequena voltagem e, assim, a transferência é rápida, não há aquecimento e não é preciso resfriar o sistema.

No método de transferência, originalmente descrito por Towbin *et al.* em 1979, os complexos proteína-SDS eram transferidos por eletroforese com tampão sem SDS e com metanol. Posteriormente, verificou-se que pequenas concentrações de SDS no tampão de transferência melhoram o rendimento. Em geral a transferência pode ser controlada, mas há vários parâmetros que afetam a sua eficiência. O tampão de transferência varia em diferentes protocolos e depende da natureza do experimento. Assim, a escolha do tampão e sobre utilizar ou não metanol depende de vários fatores, tais como o tamanho do gel, a natureza das proteínas, o tipo de membrana e a necessidade de tampões especiais para renaturar proteínas. A adição de metanol ao tampão de transferência aumenta a ligação das proteínas, principalmente as de baixo peso molecular, às membranas de nitrocelulose e de PVDF, não tendo efeito com membranas de náilon positivamente carregadas. O metanol facilita a dissociação dos complexos SDS-proteína e aumenta a interação hidrofóbica entre a proteína e a membrana. Por outro lado, o metanol pode provocar a precipitação de algumas proteínas e diminuição nos poros do gel, e pode reduzir a eficiência de eluição de proteínas de elevado peso molecular por desnaturação, pois, como o SDS é um detergente aniônico, ajuda na transferência de grandes proteínas, principalmente básicas. Proteínas de alto peso molecular não precisam de metanol para se ligar adequadamente à membrana. O metanol também impede o inchaço do gel durante a transferência, o que levaria à perda da nitidez das bandas. Mesmo na ausência do metanol, o inchaço do gel pode ser evitado com a refrigeração do sistema de transferência. A adição de SDS aumenta a mobilidade devido à carga maior, mas diminui a ligação às membranas de nitrocelulose e PVDF. Portanto, recomendam-se baixas concentrações de SDS (em torno de 0,05%), dependendo da natureza das proteínas.

A eficiência da transferência depende do tamanho da proteína, da porcentagem de acrilamida no gel, da corrente elétrica utilizada, do tempo de transferência, da membrana, do pH do tampão e da presença de metanol ou SDS no tampão. Empregando-se tampão com pH acima do ponto isoelétrico da maioria das proteínas, estas terão carga negativa e migrarão, independentemente da presença de SDS, para o polo positivo, no qual a membrana está colocada.

Para avaliar a eficiência da transferência e também localizar bandas ou padrões, pode-se realizar uma coloração de todas as proteínas do *blot*. Para esse fim, Ponceau S é o corante recomendado, pois fornece um padrão claro e a coloração é reversível, permitindo a utilização da membrana para posterior reação. A principal desvantagem é sua baixa sensibilidade. Utilizando-se uma tira, uma parte ou uma duplicata da membrana, pode-se realizar a coloração com corantes mais sensíveis, como ouro coloidal, prata, negro de amido e azul de Coomassie R-250, dentre outros. Esses corantes podem ser empregados com as membranas de nitrocelulose e PVDF. Como alternativa, podem-se incluir padrões de peso molecular pré-corados ou marcados com radioisótopos. No caso das membranas de náilon carregadas positivamente, deve-se utilizar um corante como Ferridye®, pois os outros coram a própria membrana.

Após a transferência, a membrana é processada por ensaio imunoenzimático *in situ*, conforme descrito por Towbin *et al.* em 1979, como ocorre no método da imunoperoxidase e do *immunodot*. Antes da reação, é importante que as membranas sejam incubadas com uma solução de proteína inerte (leite desnatado, BSA, gelatina) para evitar a adsorção inespecífica. Após o bloqueio a membrana é incubada com a amostra em que se quer pesquisar anticorpos, ou com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para os antígenos em estudo. Sucede-se a lavagem, a incubação com o conjugado enzimático anti-imunoglobulina específico ou com proteína A marcada com enzima, outra lavagem e a adição de substrato cromogênico, específico para a enzima. As incubações e as lavagens devem ser feitas sob agitação leve, para garantir maior uniformidade de contato entre as soluções e a membrana. Para minimizar adsorção não específica, deve-se adicionar *Tween* 20 e uma proteína inerte ao tampão de diluição. Além disso, o *Tween* 20 tem efeito renaturante de proteínas. As condições ótimas relacionadas a tempo de incubação, diluição dos anticorpos para a detecção das bandas, diluição dos conjugados, e tempo de lavagem, variam de um sistema para o outro e devem ser bem padronizadas.

Entre os vários sistemas de detecção que podem ser utilizados no *western blotting*, os mais empregados são os conjugados enzimáticos e as sondas radioativas. Nos conjugados enzimáticos, as enzimas mais utilizadas são peroxidase, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase e glicose oxidase. No caso da peroxidase, os substratos empregados são diaminobenzidina, tetrametilbenzidina e 4-cloro-1-naftol que, sob a ação da enzima, dão origem a substâncias que precipitam e se ligam à membrana nos locais onde há enzima, produzindo uma banda colorida. Com a fosfatase alcalina, o substrato de escolha é uma mistura de fosfato de 5-bromo-4-cloro-indolil (BCIP) e nitroblue tetrazólio (NBT). O BCIP é defosforilado pela enzima e oxidado enquanto o NBT se reduz, dando origem a um produto de cor roxa. Esse substrato é o mais eficiente devido à sua estabilidade e resistência ao desbotamento quando exposto à luz.

Com os conjugados enzimáticos podem-se empregar sistemas de amplificação, como a avidina/estreptavidina-biotina. Além dos substratos que dão produtos coloridos, podem-se utilizar outros sistemas de detecção, com substratos fluorescentes ou luminescentes, que permitem a quantificação das bandas. Utilizando-se sondas marcadas com radioisótopos, as bandas são detectadas por autorradiografia com grande sensibilidade.

O *western blotting* pode ser empregado na pesquisa de antígenos ou de anticorpos, sendo um importante auxiliar no diagnóstico de doenças infecciosas. Assim, pode-se determinar se há antígeno ou anticorpo em uma amostra e qual é a sua especificidade; se o preparado é puro ou não; quais proteínas estão sendo reconhecidas por um anticorpo; podem-se distinguir diferentes perfis de anticorpos, de acordo com a fase da doença ou infecção, ou de acordo com a presença ou não da infecção, e diferenciar entre cepas patogênicas e não patogênicas.

Uma variação técnica é o *western ligante blotting*, que permite a análise de qualquer interação específica entre uma proteína e seu ligante. Esse método tem sido aplicado a vários ligantes específicos, como DNA ou RNA, heparina, toxinas, hormônios, fator de crescimento, outras proteínas, cálcio e outras. Também tem sido aplicado a uma série de receptores de membrana.



## ▪ Detecção de imunoprecipitados

Anticorpos marcados por enzimas podem ser utilizados para amplificar a visualização de imunoprecipitados, substituindo-se a coloração para proteínas pelo conjugado enzimático. Em relação à coloração de proteínas, esta técnica aumenta em várias vezes a sensibilidade de detecção de um imunoprecipitado. Pode ser aplicada a qualquer técnica de precipitação em géis ou membranas, como imunodifusão, imunoelektroforese, eletroimunodifusão e imunofixação.

## ► Ensaios quimioluminescentes

A quimioluminescência é o fenômeno em que se obtém energia luminosa a partir de uma reação química. Nas reações de quimioluminescência, a energia química gerada como resultado da dissociação de ligações fracas produz compostos intermediários em um estado eletronicamente excitado que, quando retornam ao estado de energia inicial, emitem luz. É importante fazer distinção com a fluorescência, em que a fonte de energia que promove a excitação das moléculas é uma radiação incidente, e com a bioluminescência, em que a energia provém de uma reação biológica, sendo a emissão de luz facilitada por uma enzima (luciferase) ou uma fotoproteína.

A quimioluminescência pode ser utilizada como sistema de monitoramento e amplificação em uma grande variedade de testes, estando o ensaio imunoenzimático e o *immunoblotting* entre os de maior aplicação clínica. As principais vantagens dessa metodologia são:

- A elevada sensibilidade de detecção, que atinge a ordem de atomol até zeptomol ( $10^{-18}$  até  $10^{-21}$  M)
- A linearidade da curva dose-resposta, já que a emissão de luz geralmente é proporcional à concentração a partir do menor nível detectável até o ponto de excesso relativo da substância em análise
- A rapidez, pois o sinal é gerado em poucos segundos e em alguns casos permanece estável por várias horas
- O custo, devido ao emprego de reagentes em pequenas quantidades
- A utilização de reagentes não perigosos e de procedimentos simples
- A possibilidade de aumento da sensibilidade com o emprego de compostos amplificadores do sinal luminoso e reações em cascata com mais de uma enzima e de um substrato
- A possibilidade de aplicação em sistemas automatizados.

## ▪ Ensaio imunoenzimático quimioluminescente

O princípio básico do ensaio imunoenzimático quimioluminescente consiste na detecção da reação antígeno-anticorpo utilizando uma enzima e uma molécula sintetizada ou uma mistura de moléculas que atuará como substrato para a enzima e como emissor de luz. Há muitas variações da técnica, e a utilização de cada uma depende da enzima e da substância quimioluminescente utilizadas, ou do emprego ou não de compostos amplificadores. Os ensaios podem ser homogêneos ou heterogêneos.

Várias enzimas têm sido empregadas, como peroxidase, fosfatase alcalina,  $\beta$ -D-galactosidase, glicose-6-fosfato desidrogenase, xantina oxidase, aril sulfatase e  $\beta$ -D-glicosidase. A peroxidase é a enzima mais utilizada e a que dispõe de maior número de substratos quimioluminescentes: luminol (5-amino-

no-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinediona), isoluminol, polifenóis (pirogolol, purpurogalin, ácido gálico e umbiliferone) e ésteres de acridina, dentre outros. O substrato mais utilizado em ensaios imunoenzimáticos é o luminol, que é oxidado e forma um produto excitado que emite luz durante o seu decaimento ao estado fundamental. A emissão de luz ocorre apenas durante a reação enzima-substrato e, portanto, quando o substrato se esgota, o sinal cessa. As placas devem ser brancas, opacas, com a superfície altamente reflexiva. O fundo pode ser transparente ou opaco.

O princípio da quimioluminescência vem sendo utilizado em técnicas semi e não automatizadas, além de ser bastante aplicado em sistemas automatizados, que serão abordados na seção “Técnicas empregadas na automação”.

Ensaios que utilizam a quimioluminescência têm recebido diferentes denominações que variam não só de acordo com a metodologia, mas com o laboratório onde foram desenvolvidos. No teste CELIA, por exemplo, complexos covalentes de um composto luminescente (derivado do luminol) têm sido utilizados como antígeno marcado de modo semelhante que um marcador radioativo no radioensaio. O complexo ligado ao anticorpo emite luz quando tratado com peróxido de hidrogênio e acetato de cobre em pH alcalino.

O teste ELISA quimioluminescente pode ser empregado na pesquisa de anticorpos específicos, por exemplo, da classe IgG, utilizando-se anti-IgG conjugado à peroxidase, cuja ligação ao complexo antígeno-anticorpo é detectada por meio de um substrato luminescente, como o p-iodofenol-luminol-peróxido. Pela ação da peroxidase, o peróxido de hidrogênio promove a oxidação do luminol, formando um radical luminol. Esse radical forma um endoperóxido que, por decomposição, dá origem ao diânion 3-aminoftalato, eletronicamente excitado. Este diânion, quando retorna ao estado basal, emite luz que é detectada por fotodetectores, como filme fotográfico (luminômetro de câmera) ou tubos fotomultiplicadores (luminômetros convencionais ou leitores de placa para luminescência). Os derivados do fenol (p-iodofenol e p-fenilfenol) e derivados do 6-hidroxibenzotiazol amplificam a emissão de luz atuando como mediadores da transferência de elétrons entre a peroxidase e o luminol. A emissão de luz diminui lentamente e sua intensidade pode ser 1.000 vezes maior do que sem a amplificação. Esse ensaio apresenta elevada sensibilidade, podendo ser utilizado para detectar antígenos, haptenos e anticorpos específicos.

Há vários ensaios que utilizam a enzima fosfatase alcalina e o substrato adamantil 1,2-dioxetano aril fosfato. Pela ação da enzima, o substrato é defosforilado e fornece um fenóxido intermediário que se decompõe em adamantanona e aril éster (emissor). A luz emitida a 477 nm persiste por mais de uma hora, podendo ser amplificada por vários compostos, incluindo polímeros, que fornecem um ambiente hidrofóbico, e por fluoresceína na presença de detergentes, pela transferência de energia.

Arakawa *et al.*, em 1998, desenvolveram um ensaio imunoenzimático quimioluminescente da  $\beta$ -D-galactosidase (betagal) com base na quimioluminescência do indol. Como substrato da betagal e emissor de luz foi empregado o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-gal). O X-gal é hidrolisado pela betagal e libera indoxil livre que se oxida em corante índigo e, simultaneamente, produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que reage com o X-gal residual na presença de peroxidase, emitindo luz. Há uma série de métodos que utilizam a enzima betagal como marcador, incluindo o ensaio fluorométrico com 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-galactosídeo, o ensaio



colorimétrico com o-fenil- $\beta$ -D-galactosídeo, o ensaio bioluminescente com luciferase e o ensaio quimioluminescente com dioxetano, luminol e indol.

Os ensaios quimioluminescentes têm sido empregados na pesquisa de antígenos, anticorpos e haptenos em uma grande variedade de patologias, como na detecção de vírus ou antígenos virais (citomegalovírus, rotavírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C), bacterianos (leptospiras, *Clostridium botulinum*); de *Chlamydia trachomatis*; na pesquisa de anticorpos em infecções virais (hepatite B, hepatite C, citomegalovírus, herpes simples, HIV-1, HTLV-I e II, parvovírus B, rubéola), parasitárias (*T. cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Toxoplasma gondii*), fúngicas (*P. brasiliensis*), bacterianas (*Campylobacter*); e na pesquisa de IgE total e específica para uma grande variedade de alérgenos. De modo geral, a quimioluminescência é considerada mais sensível do que a detecção colorimétrica.

### Enzimaimunoensaio quimioluminescente com nanopartículas

A utilização de nanopartículas, como o ouro coloidal, devido às suas propriedades, oferece excelentes perspectivas para a detecção nos ensaios quimioluminescentes.

Em comparação com outros marcadores, as nanopartículas são mais estáveis, mais baratas e de mais fácil purificação. As nanopartículas de ouro coloidal podem ser facilmente preparadas em uma gama de tamanhos, entre 2 e 100 nm; a atividade bioquímica das biomoléculas marcadas se mantém após o acoplamento ao ouro coloidal. A reação entre o  $\text{Au}^{3+}$  e o luminol é um tipo clássico de ensaio quimioluminescente, em que  $10^{-9}$  M íons de  $\text{Au}^{3+}$  podem ser detectados.

Como as nanopartículas contêm milhares de átomos de Au (uma nanopartícula esférica de ouro de 20 nm contém  $2,3 \times 10^5$  átomos de Au), a dissolução oxidativa do metal em soluções ácidas permite detectar concentrações da ordem de pico molar. Fan *et al.* (2005, 2006), empregando luminol como agente emissor e solução oxidante composta por HCl 0,01 M, NaCl 0,5 M e  $\text{Br}_2$  0,5 mM, detectaram  $3,1 \times 10^{-12}$  M de IgG humana.

Duan *et al.* (2008) desenvolveram um imunoensaio quimioluminescente em microplaca para IgG humana com um limite de detecção de 80 pM. Nesse ensaio,  $\text{AgNO}_3$  é reduzido a átomos de Ag pela ação catalítica das nanopartículas de ouro esféricas de 8 a 68 nm de diâmetro. Por sua vez, o luminol é oxidado a radical luminol que, reagindo com o oxigênio dissolvido, emite luz forte e rápida a 425 nm.

### ▪ Western blotting quimioluminescente

A quimioluminescência tem sido muito aplicada como sistema de detecção da reação antígeno-anticorpo no *western blotting*, consistindo em uma técnica rápida e sensível de amplificação do sinal. Neste caso, em vez de utilizar um substrato colorimétrico da enzima, emprega-se um substrato quimioluminescente, sem a necessidade de alterar qualquer outra etapa dos protocolos.

As técnicas que utilizam a peroxidase e uma mistura de luminol, peróxido de hidrogênio e um amplificador, como o p-iodofenol, e as que empregam a fosfatase alcalina e adaman-til 1,2-dioxetano fenil fosfato como substrato são muito sensíveis e promovem a emissão de luz por mais de 30 min, sendo ideais para os testes que utilizam membranas, como *western blotting* e *immunodot*, em que a emissão de luz é detectada com um filme fotográfico ou de raios X.

Há vários substratos disponíveis comercialmente, à base de luminol/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , com diferentes amplificadores para a peroxidase.

Nos sistemas que utilizam a peroxidase, o tempo de ação do substrato varia, geralmente, entre 1 e 5 min e o tempo de exposição ao filme de raios X, entre 10 e 60 segundos. Em seguida, os filmes são processados e as bandas podem ser escaneadas para quantificação em densitômetro. O sinal detectado é proporcional à quantidade de antígeno colocado no gel, porém o coeficiente de correlação difere para cada sistema antígeno-anticorpo.

Para aumentar a sensibilidade de detecção, o tempo de ação do substrato e/ou o tempo de exposição aos raios X podem ser aumentados, pois os substratos quimioluminescentes podem emitir luz estável por até 24 h, fornecendo uma boa definição sem aumentar as reações de fundo. Por outro lado, o sinal gerado pelos substratos colorimétricos geralmente atinge o máximo após 30 min até poucas horas após o início da revelação, e incubações mais demoradas tendem a apagar sinais mais fracos devido ao aumento concomitante da coloração inespecífica. Desse modo, os substratos quimioluminescentes apresentam uma grande vantagem sobre os colorimétricos em sistemas com baixos níveis de proteínas e quando a quantidade de amostra é muito pequena.

### ▪ Immunodot quimioluminescente

Utilizando a metodologia do *dot-blot* ELISA, foi descrita uma técnica denominada MABA (*multiple antigen blot assay*) para a pesquisa simultânea de anticorpos específicos para espécies diferentes de parasitos, em que os antígenos são distribuídos e imobilizados em tiras de nitrocelulose e expostos ao soro imune. A reação é detectada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase e revelada por um substrato quimioluminescente, e os resultados registrados em filme. Este sistema pode ser utilizado para detectar anticorpos e antígenos circulantes.

## ► Microscopia imunoelétrica

A microscopia imunoelétrica é uma metodologia muito importante para a identificação de antígenos e de anticorpos em nível ultraestrutural, empregando globulinas conjugadas a marcadores eletrondensos.

Como nas demais técnicas utilizadas para a pesquisa de antígenos, sejam elas imunocitoquímicas ou não, na microscopia imunoelétrica podem ser utilizados anticorpos policlonais ou monoclonais, sendo obtidos resultados diferentes. Os antissoros policlonais são mais sensíveis, porém menos específicos do que os anticorpos monoclonais, pois o antissoro policlonal contém anticorpos contra vários epítomos do antígeno, enquanto o monoclonal é monoespecífico. A inespecificidade ou reação de fundo é conferida pelos anticorpos do antissoro policlonal que reagem com outros antígenos. Antissoros potentes podem ser utilizados em altas diluições, diminuindo a reação de fundo. O emprego de monoclonal dirigido contra um determinado epítopo produz uma reação praticamente sem coloração de fundo, porém com menor sensibilidade. Nas técnicas que amplificam o sinal, como imunofluorescência, imunoperoxidase ou avidina/estreptavidina-biotina, esse efeito da menor sensibilidade não é tão importante quanto na microscopia imunoelétrica. O emprego de misturas de anti-

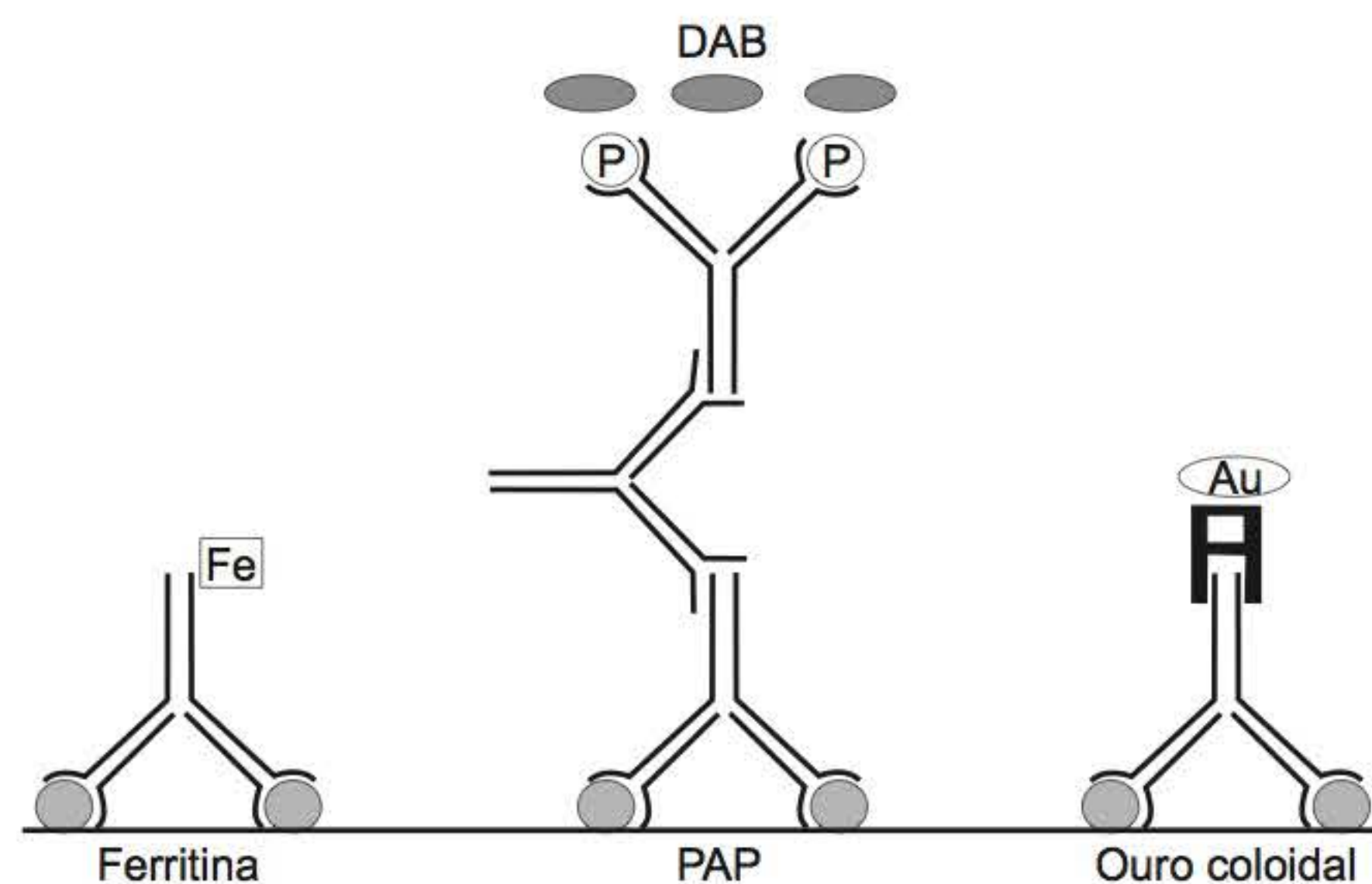


corpos monoclonais dirigidos contra diferentes epítomos do antígeno pode aumentar bastante a sensibilidade do sistema. Quando se empregam anticorpos monoclonais, é necessária uma ponte entre o monoclonal e o sistema de detecção, que pode ser efetuada por antissoro de coelho anticomundongo.

Do mesmo modo que em outras técnicas imuno-histoquímicas, é necessário manter um controle de qualidade quanto à especificidade das reações de imunocoloração. Podem-se realizar controles externos, internos e negativos não imunes. Exemplo de controle externo é a coloração de outro tecido que sabidamente contenha o antígeno em estudo (controle externo positivo), ou que esteja livre do antígeno (controle externo negativo). Exemplos de controles internos consistem na identificação no tecido em estudo de sítios sem o antígeno (controle interno negativo) e de outros sítios com o antígeno (controle interno positivo). O controle negativo não imune consiste na imunocoloração com anticorpo marcado não específico ou na coloração com todos os reagentes, exceto o anticorpo específico marcado.

Há dois tipos básicos de microscópios eletrônicos. O microscópio eletrônico de transmissão projeta elétrons através de uma camada fina da amostra, produzindo uma imagem em duas dimensões na tela. O microscópio eletrônico de varredura produz uma imagem em três dimensões, por meio de detectores de elétrons que são gerados quando os feixes de elétrons incidentes colidem com os átomos da amostra. Há microscópios eletrônicos de varredura que apresentam sensores para vários tipos de radiações secundárias geradas.

Elétrons secundários, elétrons *backscattered*, raios X e catodoluminescência são alguns dos tipos de radiação gerados quando os feixes primários de elétrons colidem com a amostra e interagem com os átomos dela. Os elétrons secundários são liberados pela colisão dos feixes de elétrons incidentes com os elétrons dos átomos da superfície da amostra. O número de elétrons detectado depende da topografia da amostra, obtendo-se imagens da superfície com resolução muito alta, de aproximadamente 10 nm. Os elétrons *backscattered* são gerados pelas colisões com os núcleos dos átomos da amostra. Neste caso, o número de elétrons gerado praticamente não depende da topografia da amostra, mas sim do seu número atômico, obtendo-se imagens das estruturas abaixo da superfície, com resolução entre 50 e 200 nm.



**Figura 2.17** Microscopia imunoelétrica. Esquema das técnicas de imunoferritina, peroxidase-antiperoxidase (PAP) e do ouro coloidal. DAB = diaminobenzidina; Au = ouro coloidal; P = peroxidase; Fe = ferritina.

A imunocoloração para a microscopia eletrônica deve resultar na localização das moléculas eletrondensas nos sítios onde se encontram o anticorpo marcado e o antígeno. Para essa finalidade, os marcadores podem ser classificados em três categorias principais:

- Moléculas orgânicas com elétron-opacidade estrutural: ferritina, hemocianina, vírus de plantas, bacteriófagos, esferas de látex, esferas de sílica coloidal, esferas do copolímero de metacrilato, isotiocianato de fluoresceína, esferas de dextrana com ferro, esferas do copolímero de metacrilato com ferro coloidal
- Enzimas cujo produto de reação pode ser detectado após a adição de um substrato: peroxidase, fosfatase alcalina
- Metais pesados que possam ser visualizados diretamente: ouro coloidal. Na Figura 2.17 estão esquematizados os principais métodos.

### ▪ Método da imunoferritina

Em 1959, Singer utilizou um anticorpo marcado com a ferritina para a localização de antígenos em nível ultraestrutural. A ferritina é uma proteína que contém ferro complexado, sendo altamente eletrondensa. Sua molécula tem entre 10 e 12 nm de diâmetro e peso molecular aproximado de 450.000. Anticorpos podem ser ligados à ferritina por meio de ligantes divalentes, e esses conjugados podem ser utilizados em métodos diretos ou indiretos para localizar histoquimicamente antígenos ou anticorpos por microscopia eletrônica. A conjugação da ferritina ao anticorpo faz com que a atividade deste diminua, sendo necessário utilizar anticorpos de alta atividade. O emprego de anticorpos híbridos, que contêm duas especificidades, uma para a ferritina e outra para o antígeno, facilita o método, diminuindo a coloração não específica. A ferritina pode ser utilizada em microscopia eletrônica de transmissão ou varredura. Este método está sendo substituído por outros.

### ▪ Método enzimático

Em 1966, Graham e Karnovsky desenvolveram métodos citoquímicos para localizar a atividade da enzima peroxidase. A partir daí, Nakane e Pierce, em 1967, e outros realizaram a conjugação de anticorpos à enzima para emprego na microscopia eletrônica. A peroxidase (peso molecular 40.000) é a enzima utilizada quase que exclusivamente, pois os produtos de oxidação do cromógeno diaminobenzidina formam um precipitado insolúvel que, após quelação com tetróxido de ósmio, torna-se eletrondenso. Em 1970, Sternberger *et al.* desenvolveram a técnica da peroxidase-antiperoxidase (PAP). O complexo PAP é formado por três moléculas de enzima ligadas por duas moléculas de anticorpos antiperoxidase. Este método tem sensibilidade e resolução superiores às dos outros métodos enzimáticos. Os anticorpos marcados com enzimas têm maior sensibilidade de detecção devido à amplificação do sinal promovida pela enzima, e penetram nos tecidos mais facilmente, devido ao menor tamanho da enzima. Este método apresenta várias desvantagens, como a presença de partículas nos cromógenos e a possibilidade de formação de precipitados muito densos que podem obscurecer a preparação.

O método enzimático pode ser utilizado na visualização em microscopia de transmissão ou varredura com sensor para elétrons *backscattered*. Como no caso da ferritina, este método está sendo substituído por outros.



## ▪ Método do ouro coloidal

Anticorpos podem ser conjugados ao ouro coloidal, sendo empregados principalmente na identificação de antígenos de superfície. A técnica do ouro coloidal para a localização de antígenos na superfície de células foi descrita por Faulk e Taylor, em 1971. Os autores empregaram anticorpos específicos adsorvidos a partículas de ouro coloidal para visualizar antígenos de *Salmonella* utilizando microscópio de transmissão. Em 1975, Horisberger *et al.* empregaram o ouro coloidal na microscopia eletrônica de varredura.

É um dos métodos mais utilizados, pois apresenta várias vantagens. As partículas de ouro podem ser preparadas de vários tamanhos (2 a 100 nm), com grande uniformidade; os métodos de preparo são simples (dispersão ou condensação) e resultam em suspensões estáveis. As partículas de ouro coloidal devem ser estabilizadas por soluções de macromoléculas proteicas (lectinas, glicoproteínas, proteína A, avidina, imunoglobulinas, F(ab')<sub>2</sub>, enzimas, toxinas, soroalbumina bovina) que, além de protegê-las da agregação promovida por eletrólitos, podem ser utilizadas como marcadores. A ligação entre as partículas de ouro coloidal que formam uma suspensão hidrofóbica carregada negativamente e as macromoléculas ocorre por adsorção eletrostática não covalente (forças de atração de van der Waals-London), em condições adequadas de pH e concentração. A interação é estável e parece não alterar a atividade biológica das macromoléculas adsorvidas. A proteína A é uma das mais empregadas, ligando-se à Fc de IgG. Como a proteína A não se liga bem a anticorpos de camundongo, e como os monoclonais, em sua maioria, são preparados nesse animal, deve-se empregar um anticorpo de coelho anticamundongo para fazer uma ponte. Uma alternativa é ligar o ouro ao antissoro de coelho anticamundongo que, no entanto, diminui a sensibilidade

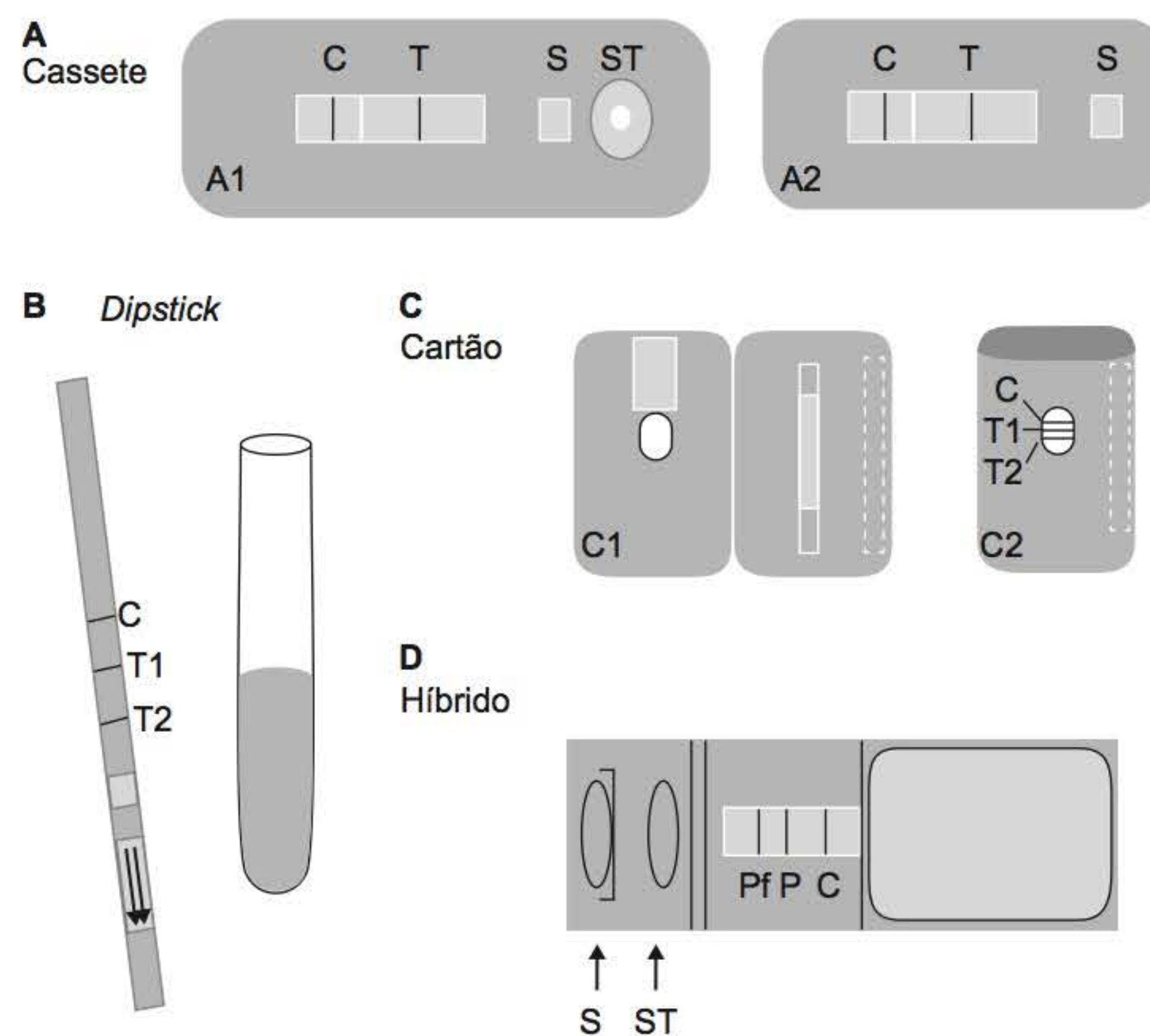
de detecção. O ouro coloidal também pode ser ligado diretamente ao anticorpo de detecção, permitindo um método em uma etapa, porém é necessário utilizar maior quantidade de anticorpo monoclonal para estabilizar as partículas de ouro.

O ouro coloidal pode ser aplicado também para marcar componentes intracelulares. Por ser um grande emissor de elétrons secundários, as partículas de ouro coloidal podem ser visualizadas na microscopia de varredura. As constantes de ligação dos marcadores com ouro coloidal à superfície celular são elevadas, facilitando o processamento para a microscopia eletrônica. O fato de ser particulado garante maior facilidade na identificação e quantificação da intensidade de marcação das estruturas.

A facilidade no preparo ou aquisição dos marcadores com ouro coloidal, bem como sua estabilidade, quando armazenados em condições adequadas, são fatores que têm contribuído para seu grande emprego nos estudos de imunocitoquímica.

## ► Ensaios imunocromatográficos

A pesquisa do hormônio gonadotrofina coriônica humana na detecção da gravidez foi a primeira aplicação diagnóstica do teste imunocromatográfico. A partir daí, a necessidade de testes rápidos para o diagnóstico laboratorial e em locais com poucos recursos, como em situações de campo, e no ponto de atendimento (*point-of-care*) tem elevado o interesse no desenvolvimento de testes imunocromatográficos de fluxo lateral para a detecção de antígenos e anticorpos em várias infecções. Os testes rápidos podem ser encontrados em quatro formatos diferentes: cassete, *dipstick*, cartão ou híbrido, que combina diferentes elementos (exemplos na Figura 2.18).



**Figura 2.18** Exemplos de diferentes formatos de testes rápidos ou imunocromatográficos. **A.** Cassete. A fita de nitrocelulose é encaixada em um cassete plástico. Linha controle (C), linha teste (T) e cavidades para amostra de sangue (S) e para solução tampão (ST) (A1: exemplo de cassete com cavidades separadas para amostra de sangue e solução tampão; A2: exemplo de cassete com cavidade combinada para amostra de sangue e solução tampão); **B.** *Dipstick*. A fita de nitrocelulose é colocada nas cavidades contendo sangue e tampão; **C.** Cartão. A fita de nitrocelulose é montada em um cartão. Amostra de sangue e solução tampão são colocadas em um bloco absorvedor e o cartão é fechado para leitura (C1: cartão aberto; C2: cartão fechado); **D.** Híbrido. Com elementos combinados de cassete e *dipstick*, a fita é mergulhada nas cavidades e é, então, colocada no cassete para leitura. Adaptado de WHO, 2011a.

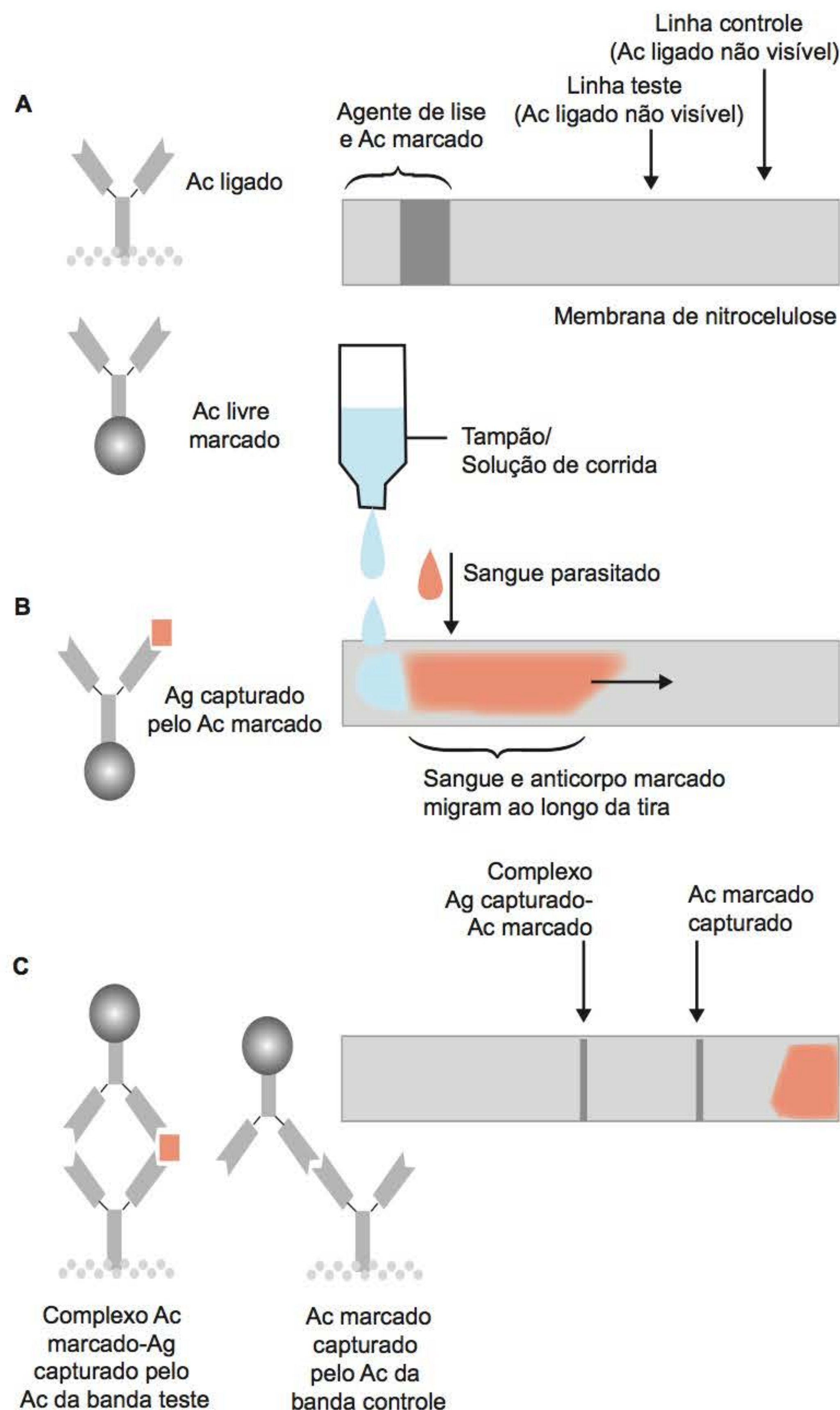


Esses métodos podem ser empregados em soro diluído, para a pesquisa de anticorpos, ou em soro, sangue, saliva, urina ou fezes, para a detecção de antígenos. Fornecem um teste qualitativo, de fácil execução, simples, rápido (10 a 15 min) e barato para detectar antígenos e anticorpos. Seus resultados são de fácil interpretação e incluem controles positivos e negativos, não havendo necessidade de aparelhos ou instrumentos para realizar a leitura, dispensando também eletricidade e treinamento prolongado.

Em geral, utilizam uma matriz de membrana de nitrocelulose que contém um número apropriado de áreas para cada reagente

(antígeno ou anticorpo) e controle do teste. O restante da membrana de nitrocelulose é bloqueado com proteína inerte, de modo semelhante ao que ocorre no *immunodot* ou *western blotting*.

O reagente de detecção pode ser marcado com corante coloidal, enzimas ou ouro coloidal. Para a detecção de antígeno emprega-se um anticorpo de captura, ligado à membrana, e um anticorpo marcado específico para o antígeno. Para a detecção de anticorpo utiliza-se um antígeno apropriado, ligado à membrana, e um anticorpo anti-imunoglobulina marcado. Na Figura 2.19 está esquematizado o mecanismo geral do teste imunocromatográfico para pesquisa de antígeno.



**Figura 2.19** Componentes e mecanismo geral dos testes imunocromatográficos para pesquisa de antígeno. **A.** O anticorpo marcado (Ac marcado), específico para o antígeno-alvo, está na parte inferior da fita de nitrocelulose ou em uma cavidade do sistema. O anticorpo de captura, específico para o antígeno-alvo, está ligado à membrana na linha "teste". O anticorpo (específico para o Ac marcado) ou antígeno está ligado à membrana na linha "controle". Antes da reação, essas linhas não aparecem. **B.** Amostra (sangue, soro, saliva, urina) e tampão são colocados no local indicado. Pela adição da amostra e do tampão, o Ac marcado é solubilizado e migra no fluxo da amostra. Se o antígeno-alvo estiver presente na amostra, vai se ligar ao Ac marcado, formando um complexo antígeno-Ac marcado. **C.** Ao passar pela região da membrana em que o anticorpo de captura está imobilizado, o complexo antígeno-Ac marcado será retido na linha "teste" e haverá desenvolvimento de cor proporcionalmente à quantidade de antígeno presente na amostra. O anticorpo marcado livre será retido na linha "controle", havendo desenvolvimento de cor. Adaptado de WHO, 2011b.



Os ensaios imunocromatográficos têm sido aplicados em vários sistemas, como sífilis, malária, tuberculose, leishmaniose visceral, tripanossomíase africana, HIV, *influenza*, dengue e outras doenças.

## ► Técnicas empregadas na automação

Nas últimas décadas, houve grande desenvolvimento na automação dos processos do laboratório clínico, principalmente na bioquímica clínica e na hematologia, sendo a imunologia clínica uma das últimas áreas a ser automatizada.

A automação de laboratórios clínicos já percorreu um longo caminho desde os primeiros sistemas desenvolvidos. Atualmente estão disponíveis inúmeras opções, grandes e pequenas, a partir de uma variedade de fornecedores para atender às necessidades, que vão desde a automação de tarefas simples para várias funções até a automação total com aparelhos interfaceados. A automação dos imunoensaios é muito útil em bancos de sangue, laboratórios grandes, médios e até pequenos, pois fornece resultados rápidos, minimiza as variações inerentes aos processos manuais, aumenta a segurança, diminui os custos e melhora a qualidade e o desempenho do laboratório. O desenvolvimento tecnológico que levou à automação de várias técnicas no laboratório clínico tem como desafio a busca de maior eficiência.

### ■ Nefelometria

A nefelometria é um método direto de medida do espalhamento, em um determinado ângulo, de uma luz incidente, por partículas em suspensão, e é uma técnica sensível para quantificar as reações de precipitação entre antígenos e anticorpos. A quantidade de complexo formado pela reação antígeno-anticorpo quando, a uma concentração constante e em excesso de anticorpo, se vai adicionando antígeno depende diretamente da concentração do antígeno e é caracterizada por uma curva parabólica que foi descrita por Heidelberger e Kendall, em 1935. A interação entre antígeno e anticorpo, em solução, depende de muitos fatores, como concentração relativa, avides e afinidade do antissoro, tampão, pH, força iônica da solução e presença de polímeros não iônicos e hidrofílicos, como o polietilenoglicol, que aumenta a sensibilidade, a faixa de detecção e a velocidade do ensaio.

A formação de imunocomplexos em solução provoca espalhamento, absorção, reflexão e altera a transmissão de uma luz incidente que atravesse a solução. Esses fenômenos são proporcionais ao tamanho, à forma e à concentração das partículas. Com o aumento da precipitação entre antígeno e anticorpo, aumenta o espalhamento e a reflexão da luz e diminui a transmitância. Em soluções diluídas, a formação de complexos entre antígeno e anticorpo pode ser medida pelo espalhamento de uma luz incidente, que ocorre como resultado das colisões elásticas das partículas de todos os tamanhos com os fótons de luz. A quantidade e a natureza do espalhamento dependem do tamanho e forma das partículas, da concentração, do comprimento de onda da luz e do índice de refração do meio.

Para a pesquisa de antígeno os ensaios devem ser realizados na região de excesso de anticorpo, onde ocorre relação linear entre a concentração do antígeno e a densidade óptica e, para tanto, as amostras devem ser diluídas a várias concentrações diferentes. O antissoro empregado deve ser potente, altamente purificado e opticamente límpido, com especificações uniformes.

Há duas variações principais no ensaio de nefelometria, de acordo com o método de determinação utilizado:

- *Nefelometria de ponto final*, em que a leitura é feita na região de platô da precipitação. Necessita de correções, a fim de minimizar o efeito de reações de fundo, e de um tempo maior de incubação (10 min a 1 h), porém permite a realização de um número maior de testes por hora. O tempo de incubação e a altura do platô em cada ensaio dependem da avides e afinidade do antissoro. Quando o espalhamento da luz é medido antes ou imediatamente após a adição do antissoro (branco) e após um intervalo de tempo constante, tem-se o método de quase equilíbrio. A diferença entre os valores é correlacionada com uma curva de concentração de referência
- *Nefelometria cinética ou “nefelometria de taxa de aumento”*, em que há monitoramento contínuo da reação e o nefelômetro subtrai eletronicamente a reação de fundo. Não há necessidade de esperar até que o platô seja alcançado, diminuindo o tempo de incubação, porém permite o processamento de um número menor de amostras. Este método mede o pico da taxa de aumento do espalhamento, que ocorre no período de 10 segundos a 1 ou 2 min na maioria dos casos. A relação entre a quantidade de espalhamento e o tempo, após o início da reação, é sigmoidal, pois o espalhamento depende do tamanho relativo dos complexos e da concentração do antígeno. No início, os complexos são pequenos e não espalham a luz. Após um limiar, o espalhamento aumenta proporcionalmente ao tempo. Conforme os reagentes se esgotam, a taxa de aumento do espalhamento diminui e este se aproxima do valor máximo. Na região de excesso de anticorpo, o ponto de inflexão da curva da taxa de aumento fornece a taxa máxima (ou pico) de formação do complexo e é proporcional à concentração do antígeno. A taxa máxima de aumento para cada reação é convertida em concentração, empregando-se curvas de referência pré-calculadas. Se comparado com a nefelometria de ponto final, é o método de escolha.

Na determinação de compostos de baixo peso molecular (com menos de 1 kDa), como hormônios, fármacos e outros haptenos, utiliza-se a nefelometria de inibição, em que os haptenos a serem dosados competem com haptenos conjugados a proteínas carregadoras pelos sítios no anticorpo específico, havendo inibição na formação dos precipitados. Pode-se utilizar o método cinético ou de ponto final.

O emprego de micropartículas inertes aumenta a sensibilidade dos ensaios nefelométricos. Neste caso, as partículas são utilizadas como suporte para os reagentes, amplificando a precipitação e o espalhamento da luz. Para essa finalidade, as características mais importantes de uma partícula são o tamanho e o índice de refração. O tamanho ideal depende do método de medida. Partículas pequenas são indicadas para ensaios cinéticos e partículas grandes, para ensaios de ponto final. O espalhamento da luz aumenta com o índice de refração do material da partícula. Vários tipos de partículas têm sido empregados como suporte, entre elas as de látex. Partículas de látex (esferas de poliestireno) com diâmetros da ordem de 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$ , contendo grupos químicos reativos, são recobertas com antígeno ou anticorpo. Assim, a presença do anticorpo ou antígeno na amostra promove a aglutinação coloidal do sistema. Pode-se ligar haptenos ou fragmentos de anticorpos para emprego em ensaios diretos ou de inibição. As técnicas de amplificação com partículas de látex têm sido as mais utilizadas, tanto na determinação de fármacos, hormônios e peptídios quanto na



de proteínas e lipoproteínas, devido à sua maior sensibilidade. A sensibilidade, a reprodutibilidade e os limites de detecção desse ensaio dependem da técnica utilizada para detectar o produto agregado. Além da nefelometria, a aglutinação de partículas de látex pode ser monitorada por outras técnicas, como turbidimetria, anisotropia angular (mudança do ângulo de polarização da luz, sendo o espalhamento medido em dois ângulos, acima e abaixo de 90°) e espectroscopia de correlação de fótons (ou espalhamento dinâmico da luz, com base no princípio de que, quando um *laser* atinge uma partícula, a mudança da frequência da luz resultante do espalhamento está correlacionada com a velocidade da partícula, que é tanto menor quanto maior o grau de agregação).

Yang *et al.*, em 2006, utilizaram nanopartículas magnéticas com núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em vez de partículas de látex e obtiveram sensibilidade três vezes maior na detecção de avidina e proteína C reativa.

Os nefelômetros podem utilizar, como fonte de luz, lâmpadas de tungstênio, mercúrio, xenônio, hélio-neônio (*laser*) etc. Os raios de luz do *laser*, ou de outra fonte de luz de alta intensidade, são coletados por lentes focalizadoras e passam através de um tubo que contém a amostra. Outras lentes coletam a luz emergente, em ângulo de 70°, e a focalizam para um detector eletrônico, que amplifica o sinal. Este é convertido em um registro digital, em unidades arbitrárias, que são relacionadas com a concentração do antígeno ou do anticorpo na amostra. Basicamente, os nefelômetros necessitam dos mesmos componentes que um fluorômetro, que pode ser utilizado na nefelometria com o mesmo filtro ou comprimento de onda, tanto para a luz incidente quanto para a resultante do espalhamento. Outros tipos de analisadores, como os de fluxo contínuo, de centrifugação, de polarização da fluorescência, ou espectrofotômetros de alta potência podem ser adaptados para ensaios nefelométricos.

A nefelometria apresenta várias vantagens, pois é precisa, rápida, de fácil realização e totalmente automatizada. Entre suas limitações estão o alto custo do antissoro, a reação inespecífica resultante de soros lipêmicos ou hemolisados e a necessidade de múltiplas diluições para antígenos muito concentrados.

Essa técnica pode ser empregada para quantificar proteínas, como imunoglobulinas, componentes do complemento, fator reumatoide, fatores de coagulação, proteína C reativa, imunocomplexos ou hormônios, fármacos e outros haptenos. Além de ter aplicações clínicas, a nefelometria é útil para monitorar a qualidade de imunorreagentes, para determinar títulos e avides de antissoros, na avaliação de monoclonais etc. Com controle de qualidade adequado e reagentes e calibradores de boa qualidade, fornece resultados altamente confiáveis, com sensibilidade de detecção da ordem de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e de 1  $\text{ng}/\text{mL}$  com partículas amplificadoras.

## ■ Turbidimetria

A turbidimetria é um método de medida da diminuição da intensidade da luz transmitida, em relação à incidente, por meio de uma suspensão de partículas, devido à reflexão, à absorção ou ao espalhamento. As leituras são feitas em unidades de absorbância, que refletem a relação entre a luz incidente e a transmitida. Em relação à nefelometria, a questão sobre qual dos dois métodos oferece melhores resultados tem sido muito debatida. Entretanto, a qualidade do aparelho parece ser mais importante do que o método. Espectrofotômetros que utilizam grade de difração monocromática são os ideais,

podendo também ser empregados aparelhos que utilizam filtros dicróicos ou de interferência. As leituras das absorbâncias devem ser realizadas em comprimentos de onda das faixas próximas do UV, entre 290 e 410 nm, região em que os complexos imunes, com diâmetros entre 35 e 100 nm, absorvem mais. Os fotodetectores dos aparelhos devem medir a luz transmitida em ângulo de 0° com a luz incidente para reduzir o efeito do espalhamento da luz sobre a medida da transmitância.

Os reagentes devem ser misturados rápida e completamente a fim de eliminar concentrações localizadas de antígeno ou de anticorpo, que podem afetar os resultados. Analisadores por centrifugação são ideais para essa finalidade, pois os reagentes são pipetados em câmaras separadas e colocados na célula de reação por força centrífuga, sendo misturados por mudanças na aceleração após 3 a 5 segundos de contato. Os efeitos da força centrífuga podem provocar a sedimentação de grandes agregados, formados por reagentes concentrados. Muitos analisadores utilizam um sistema de agitação constante em vez da força centrífuga.

As medidas de turbidimetria podem ser realizadas de dois modos: fazendo duas leituras, uma antes de colocar o antissoro e outra após um período de tempo prefixado; e realizando a medida cinética da mudança da absorbância após a adição do antissoro.

A inclusão de polímeros amplificadores, como o polietilenoglicol 8000, no tampão de reação aumenta significativamente a formação dos complexos, reduzindo o espaço vibracional e aumentando a interação entre as moléculas.

O emprego de partículas amplificadoras aumenta a sensibilidade do ensaio, como ocorre na nefelometria. Entre os vários tipos de partículas, as de poliestireno (látex) têm sido as mais utilizadas como suporte de proteínas ou de haptenos. Para que haja maior sensibilidade, o tamanho das partículas deve ser o menor possível e as leituras devem ser feitas no menor comprimento de onda possível. Os testes denominados PETIA (imunoensaio turbidimétrico com partículas de látex amplificadoras) e PETINIA (imunoensaio turbidimétrico de inibição com partículas de látex amplificadoras) apresentam elevada precisão, especificidade e podem ser aplicados a vários sistemas. Os testes de inibição são utilizados para fármacos, hormônios e outros haptenos.

Beumer *et al.* desenvolveram, em 2009, um imunoensaio turbidimétrico com nanopartículas para a dosagem do fármaco 5-fluorouracil, com base na mudança da dispersão da luz quando as nanopartículas formam agregados. O tempo para leitura do resultado é de 10 min, com fluxo de 400 amostras por hora. Na ausência de 5-fluorouracil formam-se grandes agregados, com aumento da turbidez da solução. Quando se introduz a amostra contendo 5-fluorouracil, a aglutinação é parcialmente inibida e a turbidez da solução diminui. Esse método apresenta as vantagens de ser rápido, exigir pequeno volume de amostra e permitir monitoramento eficiente do fármaco na prática clínica.

Além da qualidade do espectrofotômetro, é muito importante considerar a amostra e os reagentes utilizados. As amostras muito turvas não devem ser ensaiadas por esse método, os antissoros e demais reagentes devem ser opticamente claros.

A turbidimetria, como a nefelometria, apresenta várias vantagens: não necessita de separação entre as fases, as amostras podem ser ensaiadas diretamente sem a necessidade de pré-tratamento e o teste é rápido, preciso, econômico e facilmente automatizado.

A nefelometria é uma técnica mais sensível do que a turbidimetria, porém é mais sensível às reações de fundo, não específi-



cas, por isso é necessário que as amostras sejam muito diluídas, o que reduz os limites de detecção aos níveis da turbidimetria. Assim, os métodos turbidimétricos tendem, em alguns casos, a ser mais precisos do que os nefelométricos. Há autores que consideram a turbidimetria mais reprodutível e mais simples. Além disso, pode utilizar o espectrofotômetro, que é um aparelho mais comum à maioria dos laboratórios clínicos.

Essa técnica pode ser empregada para quantificar antígenos, anticorpos, lipoproteínas, como Lp(a), proteína C reativa, albumina, pré-albumina, hemoglobina A, proteínas ligantes de ácidos graxos (FABP), teofilina, gentamicina, tobramicina e digoxina.

### ▪ Enzimaimunoensaio

Existem sistemas e estações de trabalho (*workstations*) que realizam roboticamente os testes ELISA em microplacas, com a vantagem de poderem executar grande número de amostras. Há outros que utilizam sistemas homogêneos, como o *Enzyme-multiplied immunoassay* – EMIT®. Neste imunoensaio ocorre a inibição da atividade da enzima, conjugada a um antígeno ou hapteno, após a combinação com o anticorpo, devido ao impedimento de mudanças conformacionais necessárias para a atividade da enzima.

O hapteno é conjugado a uma enzima, que permanece ativa. A ligação do anticorpo inativa a enzima. Se houver hapteno na amostra, ele competirá com o conjugado pelos sítios do anticorpo. O resultado é o aumento da atividade enzimática, que será aproximadamente proporcional à concentração do hapteno. A mediação da atividade da enzima pelo anticorpo pode ser explicada pelo impedimento estérico para a ligação do substrato após a reação do anticorpo específico com o hapteno.

Quando as enzimas são conjugadas a moléculas de proteínas, a ligação do anticorpo específico pode acontecer em um local do antígeno distante da enzima e a modulação enzimática não ocorre. Entretanto, se o substrato for macromolecular, a ligação do anticorpo à proteína pode levar à inibição estérica da ligação ao substrato.

### ▪ Imunoensaio quimioluminescente

Quimioluminescência (ou bioluminescência) é o sinal óptico intrinsecamente mais sensível. O princípio básico do imunoensaio quimioluminescente consiste na detecção da reação antígeno-anticorpo utilizando-se uma enzima e uma molécula sintetizada ou mistura de moléculas que atuarão como substrato para a enzima e como emissor de luz. Há muitas variações da técnica, e elas devem ser empregadas de acordo com a enzima e a substância quimioluminescente utilizadas, ou dependendo da utilização ou não de compostos amplificadores.

As moléculas quimioluminescentes, as enzimas e os compostos amplificadores empregados como marcadores, bem como o princípio da quimioluminescência, os mecanismos simplificados das reações e as aplicações da técnica foram discutidos anteriormente.

A medida da luz emitida pelos compostos quimioluminescentes é chamada de luminometria e, por isso, os aparelhos que realizam essa medida são denominados luminômetros. Alguns são totalmente automatizados e outros permitem a utilização manual. Os reagentes marcados e os amplificadores, em muitos sistemas, são de propriedade do fabricante.

Vários sistemas automatizados têm sido desenvolvidos com o emprego da quimioluminescência em enzimaimunoensaios. Podem executar uma grande variedade de ensaios, em sistemas de competição ou de duplo anticorpo, para a pesquisa de antígenos, anticorpos, haptenos, fármacos, enzimas, hormônios, vitaminas, marcadores tumorais, marcadores de doenças etc. Há sistemas abertos que podem ser utilizados na pesquisa de qualquer macromolécula, e outros que se destinam, principalmente, à triagem de doadores em bancos de sangue.

### ▪ Imunoensaio fluorescente

O imunoensaio fluorescente ou fluoroimunoensaio é um método que detecta e quantifica antígenos e anticorpos utilizando conjugados fluorescentes cuja emissão de luz, de um determinado comprimento de onda, é medida com precisão em um fluorômetro. É utilizado para detectar e quantificar fármacos, hormônios, proteínas e peptídeos em fluidos biológicos. O ensaio, rápido, sensível e adaptável à automação, é uma alternativa ao radioimunoensaio e ao enzimaimunoensaio.

Quando certos tipos de moléculas interagem com fótons de radiação eletromagnética, pode ocorrer a emissão de luz, fenômeno chamado de fotoluminescência. Fluorescência, fosforescência e fluorescência tardia são tipos de fotoluminescência. Na fluorescência a liberação da energia luminosa é imediata, com um intervalo de 0,1 a várias centenas de nanossegundos entre a absorção e a emissão. Na fosforescência há demora na liberação da luz, e, na fluorescência tardia, o tempo de liberação é intermediário.

Os compostos fluorescentes ou fluoróforos são, em sua maioria, compostos orgânicos com estrutura em anel. Quando o composto absorve luz, os elétrons se tornam excitados e oscilam em ressonância. Após a absorção da luz de um comprimento de onda menor (maior energia), ao retornar ao estado basal, a energia é emitida sob a forma de luz de um comprimento de onda maior (menor energia), pois uma parte da energia se perde nas transições moleculares internas do processo. Nesse processo, o tempo entre a absorção e a emissão é pequeno: com o isotiocianato de fluoresceína, esse intervalo dura menos de  $10^{-9}$  segundos.

O imunoensaio fluorescente pode ser heterogêneo ou de fase sólida e homogêneo ou de fase fluida.

#### *Imunoensaio fluorescente heterogêneo*

O teste de imunofluorescência indireta é o precursor do fluoroimunoensaio de fase sólida, e a diferença entre eles consiste no sistema de leitura. A imunofluorescência baseia-se na observação visual comparativa, por meio de microscópio de fluorescência, enquanto o imunoensaio fluorescente baseia-se na medida objetiva e quantitativa da intensidade de fluorescência obtida pelo emprego de um sistema fotomultiplicador.

O sistema heterogêneo envolve a separação dos reagentes marcado e não marcado, eliminando em grande parte a fluorescência de fundo. Vários sistemas foram desenvolvidos, como os utilizados para medir anticorpos anti-DNA, antinúcleo, antirrubéola, antitoxoplasma e muitos outros antígenos virais. Empregando-se aparelhos de boa qualidade adequadamente calibrados, o ensaio de fase sólida permite obter medidas de excelente precisão quando comparado à imunofluorescência, em que a leitura é subjetiva. A maioria dos ensaios disponíveis comercialmente utiliza o sistema de fase sólida.

Pode-se empregar o método de competição, o indireto, o de duplo anticorpo ou o imunométrico.



### Método de competição

Na quantificação de imunoglobulinas, por exemplo, haverá competição entre a imunoglobulina da amostra (livre) e a ligada à fase sólida (fixada em superfície hidrofóbica polimérica) pelo anticorpo específico marcado com fluorocromo. A quantidade de anticorpo fluorescente ligado à imunoglobulina da fase sólida é medida em um microfluorômetro e convertida em mg/dℓ, a partir da curva padrão de inibição.

### Método indireto

Por este método podem ser medidos anticorpos contra vários antígenos. O antígeno é fixado a uma superfície polimérica e incubado com o soro. Adiciona-se conjugado anti-imunoglobulina marcado com fluorocromo e a fluorescência é quantificada.

### Método do duplo anticorpo ou do "sanduíche"

O antígeno reage com o anticorpo da fase sólida e após lavagem, com o anticorpo marcado. Após lavagem, a fluorescência é quantificada. Esse método não se aplica a haptenos.

### Método fluoroimunométrico

O antígeno reage com o anticorpo marcado em solução. O anticorpo marcado residual se liga ao antígeno da fase sólida, em que, após lavagem, se quantifica a fluorescência. Pode ser aplicado a haptenos e proteínas complexas.

### Imunoensaio fluorescente homogêneo

O sistema homogêneo não requer a separação entre o reagente marcado e o não marcado. A intensidade de fluorescência pode aumentar ou diminuir após a reação antígeno-anticorpo. Este método tem sensibilidade de detecção, em condições ótimas, perto de  $10^{-10}$  M; necessita de reagentes imunoquímicos relativamente puros; impurezas nas amostras podem aumentar a interferência das reações de fundo, e necessita de aparelhos especiais, a fim de obter maior sensibilidade.

Uma série de variantes foi desenvolvida:

- No ensaio de aumento, o antígeno marcado apresenta aumento da fluorescência quando ligado ao anticorpo. A principal desvantagem deste método é a fluorescência intrínseca do soro
- No ensaio direto de inibição da fluorescência, a ligação do hapteno cromofóbico pelo anticorpo marcado provoca diminuição da fluorescência
- No ensaio de inibição indireto, o antígeno é marcado com fluoresceína e o anticorpo específico para o antígeno inibe estericamente a ligação da fluoresceína ao anticorpo anti fluoresceína, o qual, por sua vez, quando se liga à fluoresceína, inibe a fluorescência. Pode ser empregado na determinação de antígenos e de anticorpos. No ensaio para a pesquisa de anticorpos, o anticorpo específico protege o conjugado antígeno-fluoresceína de ser inibido pelo anticorpo anti fluoresceína. O nível de anticorpo na amostra é proporcional à intensidade da fluorescência. No ensaio para a pesquisa de antígenos, o antígeno da amostra se liga ao anticorpo específico, deixando o complexo antígeno-fluoresceína livre para se ligar ao anticorpo anti fluoresceína. O nível de antígeno na amostra é proporcional à diminuição da fluorescência
- O método de transferência de energia emprega dois marcadores e pode ser direto ou indireto. No método de transferência direto, o antígeno é marcado com fluoresceína e o anticorpo, com rodamina. O isotiocianato de fluoresceína

tem pico de emissão a 525 nm e a tetrametilrodamina tem pico de absorção a 525 nm. A ligação do anticorpo ao antígeno provoca uma inibição na fluorescência da fluoresceína. Em ensaio para a quantificação de um antígeno, este não marcado compete pelo anticorpo marcado com a rodamina e diminui a inibição da fluorescência da fluoresceína

- No método de transferência indireto, o antígeno é marcado indiretamente pela ligação a um anticorpo ou a fragmentos Fab marcados com fluoresceína. Este método é aplicável a antígenos que apresentam determinantes antigênicos multivalentes. Os anticorpos ou fragmentos Fab são separados em duas porções, que são marcadas, separadamente, por fluoresceína e rodamina. A mistura do antígeno com os anticorpos marcados em proporção adequada provoca uma redução na intensidade da fluorescência da fluoresceína. A adição da amostra com antígeno não marcado altera o equilíbrio do complexo antígeno-anticorpo marcado, sendo o grau de fluorescência na solução diretamente proporcional à concentração do antígeno não marcado. Este método necessita de anticorpos purificados para evitar reações de fundo inespecíficas. Pode ser aplicado à pesquisa de haptenos e antígenos macromoleculares. A sensibilidade deste ensaio para IgG humana é da ordem de 100 pmol.

### Imunoensaio de polarização da fluorescência

No ensaio de polarização da fluorescência, o antígeno marcado com o fluorocromo compete com o antígeno da amostra por um número limitado de sítios do anticorpo específico. Quanto maior a concentração do antígeno na amostra, haverá menos anticorpo ligado ao antígeno marcado com o fluorocromo e a polarização da fluorescência diminui. A sensibilidade do método depende da afinidade do anticorpo, podendo chegar a menos de 1 ng/mL, para a pesquisa de gonadotrofina coriônica humana. É aplicável apenas à pesquisa de haptenos.

A tecnologia de polarização da fluorescência é utilizada para quantificar fármacos e haptenos em ensaio de competição direto. O fármaco marcado com fluoresceína é utilizado como marcador, que absorve e emite luz polarizada proporcionalmente ao seu tamanho. Quando livre em solução, o marcador se movimenta rapidamente e, absorvendo luz polarizada, emite luz despolarizada. Quando o marcador se liga ao anticorpo, o complexo se move mais lentamente e emite luz mais polarizada (ou menos despolarizada). O grau de polarização reflete a quantidade de marcador que está ligado e é inversamente proporcional à quantidade de fármaco na amostra. A sensibilidade para digoxina é de 0,2 ng/mL.

Para a pesquisa de macromoléculas (IgM), foi desenvolvido um imunoensaio em que o marcador é constituído de fragmentos Fab marcados com fluorocromo. O limite de detecção de IgM pelo método é de 0,8 µg/mL.

### Imunoensaio fluorescente de tempo controlado

O imunoensaio fluorescente de tempo controlado (*time-resolved fluorometry*) emprega aparelhos e reagentes especiais a fim de aumentar a sensibilidade do ensaio, cujo limiar de detecção pode chegar a  $10^{-15}$  M.

Os marcadores fluorescentes convencionais, como fluoresceína e rodamina, são indicados para a determinação de antígenos, anticorpos, fármacos e outros haptenos em concentrações de ordem micromolar, porém não têm a atividade específica necessária para a determinação em concentrações da ordem de nano e picomolar.

Os quelatos de lantanídeos, em combinação com o fluorômetro de tempo controlado, eliminam as reações de fundo



que interferem quando se utilizam fluoróforos convencionais, como o isotiocianato de fluoresceína, o que aumenta a sensibilidade de detecção.

Os fluorômetros de tempo controlado permitem medidas cinéticas da reação antígeno-anticorpo, minimizando a interferência da fluorescência de fundo e aumentando a sensibilidade e especificidade do ensaio. No fluorômetro de tempo controlado, um pulso rápido de luz excita o fluoróforo, que deve ter meia-vida longa, e a fluorescência é medida depois de transcorrido um período da excitação.

As sondas fluorescentes empregadas nesse ensaio podem ser utilizadas com o ácido pirenobutírico, que tem meia-vida de 100 ns, ou com os quelatos de európio ou de térbio. O európio complexado ao isotiocianatofenil-DTTA é utilizado para marcar anticorpos do mesmo modo que os derivados da fluoresceína e da rodamina. Os quelatos de európio apresentam propriedades que os tornam indicados para esse tipo de ensaio, pois a diferença entre o comprimento de onda de excitação e o de emissão é de, aproximadamente, 300 nm e a meia-vida é da ordem de 1 ms, enquanto o tempo de decaimento da fluorescência inespecífica é geralmente menor, variando entre 5 e 20 ns.

Nos fluorômetros de tempo controlado, o quelato de európio é excitado por *flashes* rápidos, com duração de menos de 0,5  $\mu$ s e, durante os 400  $\mu$ s seguintes a cada *flash*, o fotodetector fica fechado enquanto a fluorescência inespecífica é emitida. Nos 400  $\mu$ s seguintes a fluorescência do quelato de európio é medida. Após 1 ms, um novo ciclo se inicia. Os ciclos são repetidos mil vezes por segundo.

Devido às diferenças no tempo de decaimento dos quelatos de lantanídeos, é possível desenvolver ensaios para a pesquisa de mais de um antígeno ou hormônio simultaneamente, empregando a fluorimetria de tempo controlado e diferentes fluoróforos.

Os sistemas comerciais baseiam-se em ensaios de competição e duplo anticorpo. Este método tem sido utilizado na determinação de hormônios, fármacos, antígenos etc. com alta sensibilidade.

### Enzimaimunoensaio fluorescente

O imunoensaio fluorescente com enzimas ou enzimaimunoensaio fluorescente pode ser homogêneo ou heterogêneo.

#### Imunoensaio fluorescente com substrato marcado

O imunoensaio fluorescente com substrato marcado (do inglês *substrate-labelled fluorescent immunoassay* – SLFIA) é um sistema homogêneo, em que um substrato da enzima é ligado covalentemente a um hapteno de modo que a ligação do anticorpo ao hapteno inibe a ação da enzima sobre o substrato. Em um ensaio típico para a pesquisa de haptenos, um substrato fluorogênico da  $\beta$ -galactosidase, o  $\beta$ -galactosil umbeliferone, é ligado covalentemente ao hapteno, formando um substrato não fluorescente. Se o anticorpo específico reage com o hapteno, a enzima  $\beta$ -galactosidase não cliva o substrato por impedimento estérico. Se a amostra tiver hapteno, este se ligará ao anticorpo e o substrato ligado ao hapteno ficará livre e reagirá com a enzima para formar um produto fluorescente. O grau de fluorescência é proporcional à quantidade de hapteno na amostra. A excitação é feita a 400 nm e a emissão da fluorescência é medida a 453 nm. Detecta níveis de 1  $\mu$ g/ml.

Pode ser utilizado para detectar reagentes de alto e baixo peso molecular, tais como anticorpos, fármacos e outros haptenos.

### Enzimaimunoensaio fluorescente heterogêneo

O enzimaimunoensaio fluorescente heterogêneo (do inglês *enzyme linked fluorescent immunoassay*) é utilizado na pesquisa de antígenos e anticorpos em uma ampla variedade de sistemas. O ensaio para a pesquisa de lipoproteína (a) [Lp(a)], por exemplo, utiliza um anticorpo monoclonal anti-Apo A incorporado na fase sólida e um anticorpo policlonal anti-Apo B marcado pela fosfatase alcalina. O substrato empregado é o fosfato de 4-metil umbeliferil que, sob a ação da enzima, fornece o composto fluorescente 4-metil umbeliferone. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à concentração de Lp(a), que é expressa em g/l.

### Enzimaimunoensaio fluorescente para a pesquisa de IgE

É um enzimaimunoensaio fluorescente heterogêneo que mede a concentração de IgE específica contra mais de 450 alérgenos e permite o diagnóstico diferencial da sensibilização atópica por alérgenos inalantes comuns. Para a pesquisa de anticorpos da classe IgE específicos para um determinado alérgeno esse sistema utiliza uma técnica em que o alérgeno está ligado covalentemente à fase sólida. Se na amostra houver IgE específico, este se liga ao alérgeno e a reação é detectada pela adição de um anticorpo anti-IgE marcado pela enzima  $\beta$ -galactosidase. O substrato empregado é o metil umbeliferil- $\beta$ -D-galactosídeo, que, sob a ação da enzima, fornece o composto fluorescente 4-metil umbeliferone. As concentrações de IgE na amostra são calculadas a partir de curvas de calibração.

### ▪ Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite realizar medidas rápidas em partículas ou células enquanto elas passam, uma a uma, por um sensor, sendo as medidas realizadas em uma partícula de cada vez e não como valores médios da população total. O citômetro de fluxo analisa eletronicamente os sinais gerados pelas células em suspensão quando elas são interceptadas por um feixe de luz. Conforme as células passam através do feixe de luz, espalham a luz em todas as direções, em um padrão que depende de seu tamanho, forma e estrutura, e as moléculas marcadas com fluorocromos são excitadas e fluorescem.

A interação entre as células e uma luz intensa permite realizar várias medidas de significado biológico, como o espalhamento frontal e lateral da luz e as emissões de fluorescência. A luz decorrente do espalhamento frontal (*forward scatter cell* – FSC) é coletada por lentes posicionadas em ângulos relativamente pequenos (1 a 20°) em relação ao feixe incidente. Geralmente, células maiores provocam maior espalhamento de luz do que as menores, por isso essa medida se correlaciona com o tamanho da célula. Lentes colocadas em ângulo de 90°, em relação ao feixe incidente e ao fluxo celular, coletam a luz resultante do espalhamento lateral e da fluorescência. A medida do espalhamento lateral (*side scatter cell* – SSC) é utilizada para discriminar a granularidade da célula. As emissões fluorescentes decorrem das moléculas marcadas com fluorocromos, que se ligaram às células especificamente. A luz coletada é dividida por refletores dicróicos para tubos fotomultiplicadores separados; estes convertem os fótons emitidos ou resultantes do espalhamento em pulsos eletrônicos, que são amplificados e digitalizados. São feitos histogramas e análise estatística das medidas, sendo os resultados comparados com histogramas-controle.



A citometria de fluxo permite medir vários parâmetros celulares simultaneamente e separar subpopulações de células. Diferentes ligantes, como anticorpos monoclonais e policlonais, lectinas, hormônios, avidina e estreptavidina, podem ser conjugados a fluorocromos e permitem o estudo da distribuição de determinantes antigênicos e receptores de células e a identificação e separação de subpopulações celulares.

As aplicações e a utilização da citometria de fluxo e da separação celular em biologia e medicina têm sido cada vez mais numerosas, mas, como os citômetros de fluxo não são aparelhos simples, é necessário um conhecimento básico dos princípios de operação a fim de obter resultados precisos e significativos. São fundamentais a qualidade da preparação e coloração da amostra, o fluido e os componentes eletrônicos e ópticos do aparelho.

As medidas realizadas pelos citômetros de fluxo utilizam a luz como fonte de excitação. Assim, a iluminação deve ser intensa, pois as células são pequenas e passam através do ponto de detecção rapidamente, e a fonte de luz deve ser capaz de produzir comprimentos de onda específicos que excitam os fluorocromos. Os dois tipos de fonte de luz mais utilizados nos citômetros de fluxo são lâmpadas de arco voltaico e *laser* (*light amplification by stimulated emission of radiation*), que emite luz linearmente polarizada e é a mais utilizada. As lâmpadas de mercúrio são menos utilizadas, pois requerem sistemas ópticos mais sofisticados do que o *laser*. Os *lasers* podem ser atômicos (hélio-neônio), iônicos (íon argônio ou criptônio), moleculares (hélio-cádmio), líquidos ou sólidos.

Os citômetros atuais podem ser equipados com dois ou mais *lasers*, o que aumenta a capacidade de análise multiparamétrica, pois aumenta a diversidade de fluorocromos disponíveis. Alguns citômetros mais modernos podem detectar até 17 cores diferentes. Pode ser medida a fluorescência verde (FL1); a fluorescência amarela (FL2); a fluorescência laranja (FL3); a fluorescência vermelha (FL4) e a fluorescência roxa (FL5).

É importante conhecer o comprimento de onda de excitação de cada fluorocromo e de emissão do *laser*. O *laser* de íon argônio é o mais utilizado justamente por ter emissão a 488 nm, capaz de excitar uma grande variedade de fluorocromos. Além dos *lasers*, componentes eletrônicos, computadores e filtros ópticos têm um papel essencial no funcionamento dos citômetros de fluxo. A função de alguns filtros é absorver alguns comprimentos de onda e deixar passar a luz com o comprimento de onda que interessa. A qualidade de tais filtros é da maior importância na citometria de fluxo. Deve-se sempre mantê-los em ótimo estado.

A principal função de um citômetro de fluxo detectar a fluorescência. Atualmente, as palavras-chave para se definir um sistema ideal de detecção de fluorescência são sensibilidade e medidas multiparamétricas. A sensibilidade significa que os reagentes e o aparelho devem permitir a obtenção de uma relação sinal/ruído (reação específica/reação inespecífica) elevada. As medidas multiparamétricas correspondem à análise simultânea de vários marcadores diferentes empregando fluorocromos distintos, que podem ser quantificados independentemente. Essas medidas permitem a correlação de marcadores biológicos múltiplos em células individuais.

### **Separação de células ativadas por fluorescência**

O separador de células ativadas por fluorescência (FACS) é um citômetro de fluxo que, além de medir a intensidade da fluorescência de cada célula marcada, separa as subpopulações de células com diferentes antígenos de superfície, marcados

pelos anticorpos fluorescentes distintos, de acordo com sua fluorescência característica.

Nos últimos anos, foi desenvolvido um número muito grande de anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície de células humanas. Esses anticorpos podem ser marcados com fluorocromos direta ou indiretamente e ser empregados para caracterizar subpopulações de células.

A separação celular permite que subpopulações de células ou partículas sejam separadas da amostra com alto grau de pureza, que pode chegar a 95% ou mais, sendo possível o exame morfológico ou o emprego em ensaios funcionais ou outros, o que a torna um método útil na pesquisa e no diagnóstico de muitas patologias, incluindo câncer e AIDS.

A separação de células pelo FACS pode apresentar limitações quando se deseja fazer separações seriadas em um grande número de células ou separação de células pouco frequentes. Nesses casos, pode-se combinar a técnica de separação de células ativadas por fluorescência com outros métodos capazes de separar com rapidez grande número de células. Exemplos dessas técnicas são filtração por tamanho, separação por densidade no Ficoll e separação magnética. A aplicação desses métodos de pré-enriquecimento apresenta várias vantagens: reduz o tempo de processamento da amostra; permite a diminuição do fluxo, aumentando a precisão e o rendimento da separação devido a menor taxa de coincidência, e facilita a identificação de células por diminuir a quantidade das células predominantes e a sobreposição com as pequenas populações.

### **■ Ensaios multiparamétricos**

Em geral, os testes sorológicos clássicos permitem a medida de antígenos ou anticorpos individualmente. Porém, há circunstâncias em que é desejável medir mais de uma substância em uma amostra biológica, e essa necessidade tende a aumentar com a heterogeneidade molecular e a complexidade dos sistemas biológicos.

Painéis de testes frequentemente são solicitados pelos clínicos como auxiliares ao diagnóstico e no acompanhamento de doenças em várias áreas da Medicina. Exemplos desses painéis de testes incluem a análise simultânea de tiroxina e tirotrópina (tireoide), lutropina, folitropina e prolactina (gônadas), vitamina B<sub>12</sub> e folato (hematopoese). No diagnóstico de disfunções endócrinas, a necessidade de medir vários hormônios ou iso-hormônios relacionados aumenta conforme os mecanismos complexos de interação entre os componentes do sistema endócrino são elucidados. Do mesmo modo, em outras áreas da Medicina, como Virologia, Hematologia, Genética e Alergologia, frequentemente é necessário medir uma série de substâncias diferentes ou identificar qual entre várias está presente. Na pesquisa de antígenos ou anticorpos em doenças infecciosas ou autoimunes, na quantificação de citocinas, no monitoramento de substâncias terapêuticas ou de abuso e na pesquisa de marcadores tumorais também há situações em que essa determinação simultânea é de grande importância.

Embora os painéis de testes sejam frequentemente solicitados, há laboratórios clínicos que, por não disporem da tecnologia necessária, analisam as amostras separadamente para cada tipo de substância.

O desenvolvimento de métodos multiparamétricos, que possibilitam a realização de múltiplos ensaios, em um único tubo, com a mesma amostra e ao mesmo tempo, tem



constituído um grande desafio. Esses sistemas são especialmente indicados para substâncias que normalmente são agrupadas em painéis e apresentam vantagens óbvias, pois possibilitam a simplificação do trabalho e o aumento do desempenho dos testes, diminuem o tempo de reação e dos volumes da amostra e dos reagentes, facilitando a distinção de substâncias que têm composição molecular heterogênea ou isoformas e permitindo a redução dos custos.

Vários tipos de ensaios foram desenvolvidos na tentativa de conseguir um ensaio multiparamétrico. As tentativas convencionais de ensaios multiparamétricos têm como princípio a combinação de dois, três ou quatro imunoenaios diferentes no mesmo sistema de reação, marcando o reagente de detecção de cada sistema com um marcador diferente. Por exemplo, foram desenvolvidos ensaios para a pesquisa de hormônios empregando-se como marcadores  $^{125}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$  ou  $^{125}\text{I}$  e  $^{57}\text{Co}$ , que são medidos independentemente. Do mesmo modo, têm sido desenvolvidos ensaios com marcadores enzimáticos, quimioluminescentes ou fluorescentes. Os lantanídeos são marcadores fluorescentes promissores, tendo sido utilizados európio, térbio, samário e disprósio, em fluorimetria de tempo controlado, com diferentes comprimentos de onda, para a pesquisa de quatro substâncias em ensaio único. Entretanto, a dificuldade na obtenção de combinações de marcadores, cujos sinais possam ser quantificados individualmente em uma mistura, tem mostrado, na prática, que um número limitado de imunoenaios simultâneos pode ser realizado utilizando-se o princípio de marcadores diferentes.

Assim, embora a ideia de medir múltiplas substâncias na mesma amostra desde o início do radioimunensaio, nos últimos dez anos a pesquisa de novas metodologias para a realização de ensaios multiparamétricos tem se intensificado.

Uma alternativa tem sido separar espacialmente as reações individuais, permitindo a utilização do mesmo marcador. Um exemplo dessa estratégia é o sistema descrito por Ekins *et al.* em 1990, utilizando a separação espacial de vários imunoenaios em uma sonda pequena e sólida, com a obtenção de um teste altamente sensível, que emprega quantidades muito pequenas ( $10^{-13}$  mol/l) de anticorpos, os quais podem ser imobilizados em microáreas de poucos  $\mu\text{m}^2$ . Essa tecnologia miniaturizada possibilita a construção de arranjos de microáreas, cada uma contendo anticorpos de captura específicos para uma substância diferente, e permitindo, em princípio, a medida simultânea de milhares de substâncias diferentes em um pequeno volume de amostra, como, por exemplo, uma única gota de sangue. Utiliza um anticorpo de captura e um reagente de revelação marcados com dois fluoróforos diferentes. Quando a substância em análise é uma macromolécula, o reagente de revelação pode ser um anticorpo marcado específico para um segundo epítipo da substância em análise, e, quando é um hapteno, pode ser a própria substância, um análogo ou anticorpo anti-idiotipo marcados, que se ligarão aos sítios não ocupados do anticorpo de captura. A aplicabilidade desse modelo foi exemplificada com o teste para tirotropina (TSH). O anticorpo de captura anti-TSH é marcado com vermelho de Texas e o anticorpo de revelação, com fluoresceína. A concentração dos reagentes é escolhida de modo que a ocupação parcial dos sítios do anticorpo de captura imobilizado seja dependente da concentração de TSH. Uma estimativa do grau de ocupação parcial é derivada da razão entre o sinal de fluorescência dos anticorpos de captura marcados e o sinal do conjugado ligado e é proporcional à concentração de TSH na amostra. A leitura dos sinais fluorescentes é feita em microscópio confocal de varredura a laser, com dispositivos para a medida de dois tipos de fluorescência, e que permite a quantificação de sinais

gerados em uma microárea inteira ou em partes de qualquer tamanho selecionado. Embora, teoricamente, um número ilimitado de substâncias possa ser ensaiado empregando-se esse sistema, devido ao volume fixo da amostra, a otimização dos limites do ensaio para todas as substâncias é mais difícil.

Outra proposta de ensaio multiparamétrico, descrita por Kakabakos *et al.* em 1992, baseia-se na sensibilização de discos de poliestireno com anticorpos monoclonais específicos. Esses discos são colocados em tiras onde os ensaios são realizados. Os anticorpos monoclonais reagem com a substância em análise e a imobilizam em uma área específica enquanto outro anticorpo biotinilado reage com a substância formando um “sanduíche”. Após a adição de estreptavidina marcada com quelato de európio formam-se áreas fluorescentes, cuja intensidade se relaciona com a quantidade de substância presente na amostra. As áreas fluorescentes são quantificadas na fase sólida seca empregando-se fluorimetria de tempo controlado. O ensaio é sensível, preciso e exato. Esse sistema potencialmente pode ser utilizado na Endocrinologia, em doenças infecciosas, na Hematologia e na Oncologia.

Áreas reativas separadas espacialmente também podem ser conseguidas imobilizando-se diferentes antígenos em membranas adequadas com técnicas de *dot*, atração ou ligação química.

Um imunensaio multiparamétrico prático utiliza a nitrocelulose como fase sólida, que contém distintas regiões cobertas com vários antígenos de agentes infecciosos. Quando se adiciona o soro, os anticorpos específicos se ligam aos respectivos antígenos. Adiciona-se conjugado de peroxidase com anti-imunoglobulina humana e, após, um substrato que dá origem a um precipitado colorido. As regiões coloridas são quantificadas por espectroscopia de reflectância.

Uma tecnologia para sintetizar e testar moléculas biológicas em um formato miniaturizado utiliza luz para dirigir a síntese química combinatória de biopolímeros em um suporte sólido. A identidade e a localização de cada biopolímero são conhecidas e a sua interação com um agente de ligação molecular pode ser medida. Esses *chips* podem ser utilizados em uma série de ensaios multiparamétricos, incluindo mapeamento de epítipos, desenvolvimento de análogos químicos e em biologia molecular.

Há grande interesse em sistemas simples de imunoenaios nos quais a reação antígeno-anticorpo é monitorada por um transdutor eletrônico ou óptico. Um cristal piezoelétrico funciona como uma microbalança, e as mudanças na massa devidas à reação antígeno-anticorpo na superfície do cristal produzem diminuição na frequência de ressonância.

Atualmente, existem duas plataformas principais em relação aos testes multiparamétricos: *microarrays* com proteínas ligadas (*chips*) e *microarrays* com micropartículas (suspensão).

### Microarranjos com proteínas ligadas

Microarranjos (*microarrays*) com proteínas ligadas são sistemas de ensaio altamente miniaturizados, em que as moléculas de captura são imobilizadas em micropontos ( $< 300 \text{ nm}$ ) de um suporte sólido, com alta densidade  $< 2.000/\text{cm}^2$ . A nanotecnologia tem permitido a produção de *nanoarrays* de proteínas altamente densos ( $< 10^6$  pontos/ $\text{mm}^2$ ). Os reagentes de captura podem ser anticorpos monoclonais, ligantes não proteicos (p. ex., aptâmeros) e proteínas que mimetizam anticorpos (p. ex., *affibodies*). Os mais comumente utilizados são os anticorpos.

Essa tecnologia apresenta várias vantagens, pois, em princípio, milhares de proteínas podem ser detectadas em uma única lâmina, permitindo pesquisar simultaneamente a presença



de muitas proteínas diferentes com um consumo mínimo de amostra. Além disso, podem ser produzidas centenas de cópias de uma matriz, permitindo que as mesmas proteínas sejam testadas repetidamente com diferentes moléculas de diferentes amostras.

Esses sistemas são utilizados não só para a detecção simultânea de múltiplos alvos, mas também para a sua análise funcional. Há vários sistemas disponíveis comercialmente para a pesquisa de marcadores tumorais, cardíacos, de doenças autoimunes, de doenças infecciosas.

### Microarranjos com micropartículas

Nos microarranjos com micropartículas (*beads*), as moléculas de captura são imobilizadas em microesferas e as biomoléculas são detectadas principalmente pela citometria de fluxo. Representam, provavelmente, o formato mais utilizado na atualidade.

De modo geral, para preparar o ensaio multiparamétrico conjuntos individuais de microesferas são conjugados com as moléculas-alvo necessárias para cada reação. Moléculas-alvo podem ser antígenos, anticorpos, oligonucleotídeos, receptores, peptídeos, substratos de enzimas etc. Um reagente fluorescente, que pode ser oligonucleotídeo, antígeno, anticorpo, receptor, é preparado para cada molécula-alvo.

Sondas de antígenos ou anticorpos fluorescentes fornecem sinais específicos para cada reação no ensaio multiparamétrico.

O sistema apresenta várias vantagens para a análise de moléculas relevantes na Biologia e Medicina, incluindo elevada sensibilidade, precisão, rapidez, economia e grande capacidade analítica. Além de reduzir o tempo do teste por realizar múltiplos ensaios simultaneamente em vez de sequencialmente, a cinética rápida das reações que utilizam microesferas permite tempos de incubação menores. Os custos são reduzidos tanto pelo tempo menor de reação quanto pela utilização de menores quantidades de reagentes e de amostra. Permite a análise de interações moleculares que podem ser realizadas apenas no formato multiparamétrico, podendo ser aplicado virtualmente a qualquer ensaio que necessite de análise de interações moleculares, incluindo pesquisa básica, diagnóstico clínico, triagem e monitoramento de fármacos etc. A maioria desses ensaios, senão todos os ensaios para moléculas de interesse biológico, pode ser adaptada ao sistema, que tem sido empregado para realizar imunoenaios qualitativos e quantitativos de múltiplas proteínas séricas em ensaios de captura e de competição.

Recentemente, uma série de imunoenaios multiplex de fluxo (MFI) foi descrita para a avaliação sorológica de várias doenças infecciosas. Essa abordagem é semelhante ao enzima-imunoenensaio tradicional, mas permite a detecção e identificação simultânea de múltiplas biomoléculas em um único ensaio. Essa tecnologia utiliza como matriz uma suspensão líquida de até 100 microesferas (de poliestireno ou magnéticas) diferentes (5 a 6 µm), cada uma conjugada com uma molécula de captura diferente. Cada biomolécula é detectada e quantificada após a adição de uma sonda marcada por fluoróforo (p. ex., ficoeritrina), cuja emissão é medida por um detector de fluxo. Esse sistema foi validado para a pesquisa de IgM e IgG na detecção de infecções congênitas por *Toxoplasma gondii*, vírus da rubéola e citomegalovírus (ToRC); na detecção de infecções pelo vírus Epstein-Barr e pelos herpes-vírus simples (HSV-1 e HSV-2); na detecção de autoanticorpos em doenças autoimunes e em vários outros imunoenaios.

No sistema MAP® (Multianalyte Profiling) são utilizadas partículas de poliestireno ou magnéticas, incorporando dois fluoróforos em 100 diferentes proporções. Várias moléculas podem ser ligadas à superfície da partícula. São utilizados dois *lasers*. O primeiro *laser* (vermelho) excita o fluoróforo interno e identifica a biomolécula pesquisada. O segundo *laser* (verde) excita o fluoróforo (ficoeritrina) da sonda e permite a quantificação. Em geral, as partículas apresentam uma grande superfície de análise (em torno de 10<sup>6</sup> moléculas de captura por partícula). Entretanto, nos imunoenaios, o número de alvos simultâneos é menor. No sistema FlexMAP 3D® foi colocado um terceiro *laser*, que teoricamente possibilita a detecção de 500 biomoléculas.

Outro sistema que utiliza a plataforma de citometria de fluxo é realizado na superfície de microesferas de poliestireno marcadas internamente com quantidades diferentes de fluoróforo. Anticorpos de captura revestem a superfície das microesferas. Imunoenaios separados podem ser realizados simultaneamente em cada tipo de microesfera. No ensaio de “sanduíche”, por exemplo, o antígeno na amostra é capturado pelo anticorpo da microesfera e detectado por meio de anticorpos biotinilados. Após a adição de estreptavidina marcada com outro fluoróforo (que emite luz em comprimento de onda diferente do fluoróforo da microesfera), é gerado um sinal. Com a utilização de microesferas de diferentes tamanhos, aumenta-se o número biomoléculas que podem ser detectadas. Também podem ser realizados ensaios de competição incorporando-se um antígeno marcado pelo fluoróforo, que competirá com o antígeno da amostra testada pela ligação ao anticorpo de captura. A plataforma foi validada para citocinas, marcadores de inflamação, proteínas intracelulares de choque térmico, proteínas de sinalização celular.

### Agradecimentos

A André Arroyo Ruiz e Sandra do Lago Moraes, por terem colaborado na elaboração das figuras.

## Bibliografia

### Introdução

- Barrett JT. Textbook of immunology – An introduction to immunochemistry and immunobiology. 5. ed. St Louis: CV Mosby, 1988. p. 191-214.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey, Prentice-Hall International, 1994. p. 151-194.
- Kricka L. Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays. Clin Chem, 1994; 40:347-357.
- Rabin BS. Introduction. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL *et al.* Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1992, p. 1.
- Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1986.
- Stenman U-H. Quantification of antigens. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA *et al.* (eds.). Weir's handbook of experimental immunology – immunochemistry and molecular immunology. 5. ed. Cambridge, Massachusetts, Blackwell Science, 1996. v.1., p. 45.1-45.7.
- Voller A. Immunoassays for tropical parasitic infections. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1993;87:497-498.

### Precipitação

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 38-65.
- Arquembourg PC. Immuno-electrophoresis – Theory, methods, identification, interpretation. 2. ed. Basel: S. Karger AG, 1975. p. 1-10.



- Caron J Penn GM. Electrophoretic and immunochemical characterization of immunoglobulins. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 84-95.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (ed). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994. p. 151-194.
- Check IJ, Piper M, Papadea C. Immunoglobulin quantitation. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 71-83.
- Dunbar BS. Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. New York: Plenum Press, 1988.
- Fukasawa LO, Salgado MM, Gonçalves MG et al. Limitações no uso da técnica de contraimunoelctroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. Boletim Epidemiológico Paulista 2010; 7(76):4-12.
- James K. Immunoserology of Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 1990; 3:132-152.
- Johnson AM. Immunoprecipitation in gels. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (ed). Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1986. p. 14-24.
- Jorgenson JW, Lukacs KD. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. Clin Chem 1981; 27(9):1551-1553.
- Jorgenson JW, Lukacs KD. Capillary zone electrophoresis. Science 1983; 222:266-272.
- Kelly RH, Vertosick Jr FT. Electrophoretic analysis of proteins. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (ed). Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1992. p. 18-26.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. Labmedicine 2006; 37:490-497.
- Martinez R, Vitalil LH, Henriques JHS et al. Inquérito soropidemiológico para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2002; 35:347-350.
- Moser AC, Hage DS. Capillary electrophoresis-based immunoassays: principles and quantitative applications. Electrophoresis 2008; 29:3279-95.
- Ouchterlony Ö, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir DM, Herzenberg LA (eds.). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986. v.1. p. 32.1-32.50.
- Rocco RM. Landmark papers in clinical chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2006. 504 p.
- Tavares MFM. Eletroforese capilar: conceitos básicos. Química Nova 1996;19:173-181.
- Tavares MFM. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. Química Nova 1997; 20:493-511.
- Vesterberg O. A short history of electrophoretic methods. Electrophoresis 1993; 13:1243-1249.
- Wild D. The immunoassay handbook. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.
- Zacharias C (2009, January 18). Capillary electrophoresis. SciTopics. Disponível em: [http://www.scitopics.com/Capillary\\_Electrophoresis.html](http://www.scitopics.com/Capillary_Electrophoresis.html). Acesso em: 14 out. 2012.
- Williams CA, Chase MW. Methods in immunology and immunochemistry. New York: Academic Press, 1977. v. 4 p. 1-90.

## ▪ Ensaios Líticos

- Almeida JO, Fife EH. Métodos de fijación del complemento estandarizado cuantitativamente para la evaluación crítica de antígenos preparados con *Trypanosoma cruzi*. Organización Panamericana de la Salud, Comunicación científica nº 319, 1976.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994. p. 151-194.
- Hardy RR. Complement fixation by monoclonal antibody-antigen complexes. In: Weir DM, Herzenberg LA (eds.). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986. v.1, p. 40.1-40.12.
- James K. Immunoserology of infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1990; 3:132-152.
- Levine L. Microcomplement fixation. In: Weir DM, ed. Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 2. ed. Philadelphia: Blackwell Scientific Publications, 1973. v. 1. p. 22.1-22.8.
- Palmer DF, Whaley SD. Complement fixation test. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 57-66.
- Williams CA, Chase MW. Methods in immunology and immunochemistry. New York: Academic Press, 1977. v. 4. p. 137-166.

## ▪ Imunofluorescência

- Barrett JT. Textbook of immunology – An introduction to immunochemistry and immunobiology. 5. ed. St Louis, CV Mosby, 1988. p. 191-214.
- Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clín 1974; 10:57-71.
- Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clín 1974; 10:87-107.
- Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clín 1974; 10:143-171.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994. p. 151-194.
- Eakin RE, Snell EE, Williams RJ. A constituent of raw egg white capable of inactivating biotin in vitro. J Biol Chem 1940; 136:801-802.
- Eakin RE, Snell EE, Williams RJ. The concentration and assay of avidin, the injury-producing protein in raw egg white. J Biol Chem 1941; 140:535-543.
- Green NM. Avidin. 1. The use of <sup>14</sup>C biotin for kinetics studies and for assay. Biochem J 1963; 89:585-586.
- Holmberg A, Blomstergren A, Nord O et al. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. Electrophoresis 2005; 26:501-510.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29:577.
- James K. Immunoserology of infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1990; 3:132-152.
- Johnson GD, Holborow EJ. Immunofluorescence. In: Weir DM (ed). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 2. ed. Philadelphia: Blackwell Scientific Publications, 1973; v. 1, p. 18.1-18.20.
- Johnson GD, Holborow EJ. Preparation and use of fluorochrome conjugates. In: Weir DM, Herzenberg LA (ed.). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986. v.1, p. 28.1-28.21.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. Labmedicine 2006; 37:490-497.
- Kresge N, Simoni RD, Hill RL. The discovery of avidin by Esmond E. Snell. J Biol Chem 2004; 279:e5-e6.
- Pryzwansky KB. Applications of double-label immunofluorescence. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). Techniques in immunocytochemistry. London: Academic Press Limited, 1989; v. 1, p. 77-89.
- Savage D, Mattson G, Desai S et al. Avidin-biotin chemistry: A Handbook. Rockford, IL: Pierce Chemical Company, 1992. p. 1-23.
- Valenzuela R, Deodhar SD. Tissue immunofluorescence. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 270-272.
- Wilbur DS, Hamlin DK, Sanderson J, Lin Y. Streptavidin in antibody pretargeting. 4. Site-directed mutation provides evidence that both arginine and lysine residues are involved in kidney localization. Bioconjugate Chem 2004; 15:1454-1463.

## ▪ Aglutinação

- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994. p. 151-194.
- Galvin JP. Particle-enhanced immunoassays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 38-42.
- Hebert WJ. Passive haemagglutination with special reference to tanned cell technique. In: Weir DM (ed.). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 2. ed. Philadelphia: Blackwell Scientific Publications, 1973. v. 1. p. 20.1-20.20.
- James K. Immunoserology of Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 1990; 3:132-152.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. Labmedicine 2006; 37:490-497.
- Nichols WS, Nakamura RM. Agglutination and agglutination inhibition assays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 49-56.
- Pollack W, Hager HJ, Reckel R et al. A study of the forces involved in the second stage of haemagglutination. Transfusion (Philadelphia) 1965; 5:158-183.
- Pollack W, Reckel RP. A reappraisal of the forces involved in hemagglutination. Int Archs Allergy Appl Immun 1977; 54:29-42.



## ■ Técnicas com marcadores radioativos

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997; p. 38-65.
- Barrett JT. Textbook of Immunology – An introduction to immunochemistry and immunobiology. 5. ed. St Louis: CV Mosby, 1988; p. 191-214.
- Bolton AE, Hunter WM. Radioimmunoassay and related methods. In: Weir DM, Herzenberg LA (eds.). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986; v.1, p. 26.1-26.56.
- Bozzola JJ, Russell LD. Electron microscopy. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 1992; p. 262-276.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994; p. 151-194.
- Dunbar BS. Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. New York, Plenum Press, 1988; p. 117-122.
- Hunter WM. Radioimmunoassay. In: Weir DM (ed). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 2. ed. Philadelphia, Blackwell Scientific Publications, 1973; v. 1, p. 17.1-17.36.
- Larsen J, Odell WD. General principles of radioimmunoassay. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1986; p. 110-115.
- Laskey RA. Radioisotope detection using X-ray film. In: Slater RJ (ed). Radioisotopes in biology – A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1993; p. 87-107.
- Laskey RA. Radiometric methods for detection in blots. In: Dunbar BS (ed.). Protein blotting – A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1994; p. 121-132.
- Miles LEM, Hales CN. Labelled antibodies and Immunological assay Systems. Nature 1968; 219:186-189.
- Newby CJ, Hayakawa K, Herzenberg LA. Solid-phase radioimmune assays. In: Weir DM, Herzenberg LA (ed). Handbook of experimental immunology – Immunochemistry. 4. ed. Oxford, Blackwell, 1986; v.1, p. 34.1-34.8.

## ■ Técnicas imunoenzimáticas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997; p. 38-65.
- Barrett JT. Textbook of immunology – An introduction to immunochemistry and immunobiology. 5. ed. St. Louis: CV Mosby, 1988; p. 191-214.
- Boorsma DM. Conjugation methods and biotina-avidin systems. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). Techniques in immunocytochemistry. London: Academic Press Limited, 1990; v. 2, p. 155-174.
- Bullock SL, Walls KW. Evaluation of some parameters of the enzyme-linked Immunospecific assay. J Infect Dis 1977; 136 (suppl.):279-285.
- Burns J. The unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase method (PAP). In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). Techniques in immunocytochemistry. London: Academic Press Limited, 1989; v. 1, p. 91-105.
- Carpenter AB. Enzyme-Linked Immunoassays. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (ed.). Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 2-9.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). Basic & clinical immunology. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994; p. 151-194.
- Crowther JR. Basic principles of ELISA. Methods Mol Biol 1995; 42: 35-61.
- Dunbar BS. Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. New York: Plenum Press, 1988.
- Dunbar BS (ed.). Protein blotting – A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- ELISA technical guide and protocols. TECH TIP 65. Disponível em: <http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf>. Acesso em: 20 set. 2012.
- Engvall E, Carlsson HE. Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA. First International Symposium on Immunochemical Techniques. INSERM Symposium nº 2: 135-147. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1976.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8:871-874.
- Espinoza CG, Livingstone SK, Azar H. Immunohistochemistry in surgical pathology: principles, methods, and quality control. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (ed). Manual of Clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 277-281.
- Garfin DE. Immunoblotting. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (ed). Manual of clinical laboratory immunology. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 47-51.
- Gibbs J. Effective blocking procedures. ELISA technical bulletin 2001; 3:1-6. Disponível em: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa3.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.

- Gibbs J. Immobilization principles – Selecting the surface – ELISA technical bulletin. 2001; 1:1-8. Disponível em: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa1.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- Gibbs J. Optimizing the immobilization of protein and other biomolecules. ELISA technical bulletin 2001; 2:1-8. Disponível em: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa2.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- Gibbs J. Optimizing the separation step on 96 well plates. ELISA technical bulletin 2001; 4:1-5. Disponível em: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa4.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- Gibbs J. Selecting the detection system – Colorimetric, fluorescent, luminescent methods. ELISA technical bulletin 2001; 5:1-14. Disponível em: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa5.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- James K. Immunoserology of infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1990; 3:132-152.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. Labmedicine 2006; 37:490-497.
- Kurstak E. Enzyme immunoassay. Orlando: Academic Press, 1986.
- Kurstak E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpolation. World Health Organization. 1985; 63:793-811.
- Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clinical Chemistry 2005; 51:2415-2418.
- Mason DY. Double immunoenzymatic labelling. In: Bullock GR, Petrusz P (ed). Techniques in immunocytochemistry. London: Academic Press Limited, 1989; v. 1, p. 135-153.
- Nakamura RM, Voller A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays: heterogeneous and homogeneous systems. In: Weir DM, Herzenberg LA (eds.). Handbook of experimental immunology immunochemistry. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986; v.1, p. 27.1-27.20.
- Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labelled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. J Histochem Cytochem 1968; 16:557-560.
- O'Kennedy R, Byrne M, O'Fagain C et al. A Review of enzyme-Immunoassay and a description of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin concentrations. Biochemical Education 1990; 18:136-141.
- Rubenstein KE. Homogeneous enzyme immunoassay today. Scand J Immunol 1978; 8(suppl. 7):57-62.
- Seppälä IJT, Mäkelä O. Quantification of antibodies. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C (eds.). Weir's handbook of experimental immunology – Immunochemistry and molecular immunology. 5. ed. Cambridge: Massachusetts, Blackwell Science, 1996; v.1, p. 44.1-44.5.
- Stenman U-H. Quantification of antigens. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). Weir's handbook of experimental immunology – Immunochemistry and molecular immunology. 5. ed. Cambridge: Massachusetts, Blackwell Science, 1996; v.1, p. 45.1-45.7.
- Voller A. Immunoassays for tropical parasitic infections. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1993; 87:497-498.
- Voller A, Bidwell D. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). Manual of clinical laboratory immunology. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986; p. 99-109.
- Wisdom GB. Enzyme-immunoassay. Review. Clin Chem 1976; 22:1243-1255.

## ■ Ensaios quimioluminescentes

- Almeida IC, Covas DT, Soussumi LM et al. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. Transfusion 1997; 37: 850-857.
- Arakawa H, Tsuji A, Maeda M. Chemiluminescent assay of  $\beta$ -D-galactosidase based on indole luminescence. J Biolumin Chemilumin 1998; 13:349-354.
- Duan CF, Yu YQ, Cui H. Gold nanoparticle-based immunoassay by using non-stripping chemiluminescence detection. Analyst 2008; 133:1250-1255.
- Fan A, Lau C, Lu, J. Magnetic bead-based chemiluminescent metal immunoassay with a colloidal gold label. Anal Chem 2005; 77:3238-42.
- Fan A, Cao Z, Li H et al. Chemiluminescence Platforms in Immunoassay and DNA Analyses. Review. Analytical Sciences 2009; 25:587-597.
- Gibbs J. Selecting the detection system – Colorimetric, fluorescent, luminescent methods. ELISA technical bulletin 2001; 5:1-14. Disponível em: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa5.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- Hage DS. Immunoassays. Analytical Chemistry 1993; 65:420R-424R.
- Hawker CD. Laboratory automation: Total and subtotal. Clin Lab Med 2007; 27: 749-770.



- Huang D, Amero SA. Measurement of antigen enhanced chemiluminescent Western blot. *BioTechniques* 1997; 22:454-458.
- Kam K-L, Hsieh K-H. Comparison of three *in vitro* assays for serum IgE skin testing in asthmatic children. *Ann. Allergy* 1994; 73:329-336.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* 2006; 37:490-497.
- Kricka L. Selected Strategies for Improving sensitivity and Reliability of immunoassays. *Clin Chem* 1994; 40:347-357.
- Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem* 1991; 37:1472-1481.
- Kricka LJ. Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin Biochem* 1994; 26:325-331.
- Mattson DL, Bellehumeur TG. Comparison of three chemiluminescent horseradish peroxidase substrates for immunoblotting. *Anal Biochem* 1996; 240:306-308.
- Nickless GG, Thorpe GH, Kricka LJ et al. A rapid chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for cytomegalovirus immunoglobulin G antibodies using instant photographic film. *J Virol Methods* 1985; 12:313-321.
- Noya O, Alarcon DE Noya B. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol Lett* 1998; 63:53-56.
- Sandhu GS, Eckloff BW, Kline BC. Chemiluminescent substrates increase sensitivity of antigen detection in Western blots. *BioTechniques* 1991; 11:14-16.
- Thermo Fisher Scientific. ELISA technical guide and protocols. TECH TIP 65. Disponível em: <http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf>. Acesso em: 20 set. 2012.
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter JN et al. Analytical luminescence: Its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1979; 25:1531-1546.
- Yakunin AF, Hallenbeck PC. A luminol/iodophenol chemiluminescent detection system for western immunoblots. *Anal Biochem* 1998; 258:146-149.

## ▪ Microscopia imunoeletrônica

- Anders GA, Hsu KC, Seegal BC. Immunological techniques for the identification of antigens or antibodies by electron microscopy. In: Weir DM, Herzenberg LA (ed.). *Handbook of experimental immunology – Immunocytochemistry*. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986; v.1, p 35.1-35.51.
- Barrett JT. Textbook of immunology – An introduction to immunochemistry and immunobiology. 5. ed. St. Louis: CV Mosby, 1988; p. 191-214.
- Bozzola JJ, Russell LD. Electron microscopy. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 1992; p. 252-261.
- Burkholder PM. Electron microscopy techniques for laboratory medicine. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 273-276.
- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). *Basic & clinical immunology* 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994; p. 151-194.
- Galletti SR. Introdução à microscopia eletrônica. *Biológico* 2003; 65: 33-35.
- Hartman AL, Nakane PK. Immunological methods in scanning electron microscopy using peroxidase. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1990; v. 2, p. 103-116.
- Horisberger M. The gold method as applied to lectin cytochemistry in transmission and scanning electron microscopy. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1989; v. 3, p. 155-178.
- Molday RS. Labelling of cell surface antigens for SEM. In: Bullock GR, Petrusz P (ed.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1990; v. 2, p. 117-154.
- Ordonneau P. Post-embedding unlabelled antibody techniques for electron microscopy. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1989; v. 1, p. 269-281.
- Roth J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1990; v. 2, p. 218-284.
- Roth J. The protein A-gold (pAg) technique. A qualitative and quantitative approach for antigen localisation of thin sections. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1989, v. 1, p. 108-133.
- Waele MDE, Mey JDE, Moeremans M et al. Immunogold staining method for the detection of cell surface antigens with monoclonal antibodies. In: Bullock GR, Petrusz P (eds.). *Techniques in immunocytochemistry*. London: Academic Press Limited, 1990; v. 2, p. 2-24.
- Warhol MJ. Immunoelectron microscopy in diagnostic pathology. In: De Lellis RA (ed.). *Advances in immunohistochemistry*. New York: Raven Press, 1988; p. 67-90.

## ▪ Ensaios imunocromatográficos

- Ende J, Van D, Vervoort T et al. Evaluation of two tests on the detection of histidine rich protein 2 for the diagnosis of imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:285-288.
- Facer CA. Rapid malaria diagnosis: an update. In: Spencer RC, Wright EP, Newsom SWB (eds.). *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Andover: Intercept, 1994; p. 129-143.
- John SM, Sudarsanam A, Sitaram U. Evaluation of OptiMAL™, a dipstick test for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92:621-622.
- Kilian AHD, Mughusu EB, Kabagambe G, Sonnenburg F. VON. Comparison of two rapid, HPR2-based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997; 91:666-667.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* 2006; 37:490-497.
- Piper R, Lebras J, Wentworth L et al. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:109-118.
- Singh N, Valecha N, Sharma VP. Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:396-397.
- Snowden KF. Dipstick methods for diagnosis of parasitic diseases. In: Spencer RC, Wright EP, Newsom SWB (eds.). *Rapid methods and automation in Microbiology and Immunology*. Andover: Intercept, 1994; p. 145-149.
- Uguen C, Rabodonirina M, De Pina J-J et al. ParaSight®-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infection. *Bull World Health Org* 1995; 73:643-649.
- World Health Organization. Malaria Rapid Diagnostic Test. Performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 3 (2010-2011), 2011b.
- World Health Organization. WHO Global Malaria Programme. Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria, 2011a.

## ▪ Técnicas empregadas na automação

- Bock JL. The new era of automated immunoassay. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:628-646.
- Hawker CD. Laboratory automation: Total and subtotal. *Clin Lab Med* 2007; 27:749-770.
- Yarnall M. Automation of immunoassays. In: Shan G. *Immunoassays in agricultural biotechnology*. Hoboken: John Wiley, 2011.
- Zaninotto M, Plebani M. The “hospital central laboratory”: automation, integration and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48:911-7.

## Nefelometria

- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). *Basic & clinical immunology*. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994; p. 151-194.
- Check IJ, Piper M, Papadea C. Immunoglobulin quantitation. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL, Friedman H, Penn GM (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 71-83.
- Chen AK. Nephelometry. In: Sheehan C (ed.). *Clinical immunology – Principles and laboratory diagnosis*. Philadelphia: Lippincott Company, 1992; p. 179-189.
- Finney H, Newman DJ, Gruber W et al. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem* 1997; 43:1016-1022.
- Galvin JP. Particle-enhanced immunoassays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (ed.). *Manual of clinical laboratory Immunology*. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986; p. 38-42.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Labmedicine*. 2006; 37:490-497.
- Ortega-Vinuesa JL, Molina-Bolivar JA, Peula JM et al. A comparative study of optical techniques applied to particle-enhanced assays of C-reactive protein. *J Immunol Methods* 1997; 205:151-156.
- Stenman U-H. Quantification of antigens. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (ed.). *Weir's handbook of experimental immunology – Immunocytochemistry and molecular immunology*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v.1, p. 45.1-45.7.
- Sternberg JC. Rate Nephelometry. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986; p. 33-37.
- Yang SY, Wu RM, Jian ZF et al. One-sample measurement in laser nephelometric immunoassay using magnetic nanoparticles. *Applied Physics Letters* 2006; 89: 244102.



## Turbidimetria

- Beumer JH, Boisdron-Celle M, Clarke W et al. Multicenter evaluation of a novel nanoparticle immunoassay for 5-fluorouracil on the Olympus AU400 analyzer. *Ther Drug Monit* 2009; 0:1-7.
- Chang J, Hoke C, Ettinger B et al. Evaluation and interference study of haemoglobin A<sub>1c</sub> measured by turbidimetric inhibition immunoassay. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:274-278.
- Foster RC, Ledue TB. Turbidimetry. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986; p. 25-32.
- Galvin JP. Particle-enhanced immunoassays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986; p. 38-42.
- Holownia P, Newman DJ, Thakkar H et al. Development and validation of an automated latex-enhanced immunoassay for prealbumin. *Clin Chem* 1998; 44:1316-1324.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* 2006; 37:490-497.
- Nichols WS, Nakamura RM. Agglutination and agglutination inhibition assays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986; p. 49-56.
- Ortega-Vinuesa JL, Molina-Bolivar JA, Peula JM et al. A comparative study of optical techniques applied to particle-enhanced assays of C-reactive protein. *J Immunol Methods* 1997; 205:151-156.
- Roberts M, Hulst FF, Van Der Fischer MAJG et al. Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1998; 44:1564-1567.
- Stenman U-H. Quantification of antigens. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Immunochemistry and molecular immunology*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v.1, p. 45.1-45.7.
- Sundvall J, Sulonen G-B, Hiltunen O et al. Comparison of a new immunoturbidimetric assay of human serum lipoprotein (a) to the ELISA and the IRMA methods. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55:171-180.

## Enzimaimunoensaio

- Bock JL. The new era of automated immunoassay. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:628-646.
- O'Kennedy R, Byrne M, O'Fagain C et al. A review of enzyme-immunoassay and a description of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin concentrations. *Biochemical Education*. 1990; 18:136-141.
- Wisdom GB. Enzyme-immunoassay. Review. *Clin Chem* 1976; 22:1243-1255.

## Imunoensaio quimioluminescente

- Babson AL, Olson DR, Palmieri T et al. The Immulite™ assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clin Chem* 1991; 37:1521-1522.
- Boland J, Carey G, Krodel E et al. The Ciba Corning ACS: 180™ Benchtop Immunoassay analyser. *Clin Chem* 1990; 36:1598-1602.
- Ikegami T, Yamamoto M, Sekiya K et al. The development of Luminomaster™, a fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay system. *J Biolumin Chemilumin* 1995; 10:219-227.
- Khalil OS, Zurek TF, Tryba J et al. Abbott Prism: a multichannel heterogeneous chemiluminescence immunoassay analyser. *Clin Chem* 1991; 37:1540-1547.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* 2006; 37:490-497.
- Patterson W, Werness P, Payne WJ et al. Random and continuous-access immunoassay with chemiluminescent detection by Access® automated analyser. *Clin Chem* 1994; 40:2042-2045.
- Yamada K, Ohashi Y, Tanaka A et al. Clinical evaluation of LUMIWARD immunoassay system for detection of specific IgE associated with allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 1988; 538:169-177.

## Imunoensaio fluorescente

- Channing Rodgers RP. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds.). *Basic & clinical immunology*. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994; p. 151-194.
- Dennehy PH, Schutzbank TE, Thorne GM. Evaluation of an automated immunodiagnostic assay, VIDAS Rotavirus, for detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32:825-827.
- Kakabakos SE, Khosravi MJ. Direct time-resolved fluorescence immunoassay of progesterone in serum involving the biotina-streptavidin system and the immobilized-antibody approach. *Clin Chem* 1992; 38:725-730.

- Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* 2006; 37:490-497.
- Kricka L. Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays. *Clin Chem* 1994; 40:347-357.
- Nakamura RM, Robbins BA. Fluorescence immunoassays. In: Rose NR, Macario EC de et al. (eds.). *Manual of clinical laboratory immunology*. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 10-17.
- Paganelli R, Ansotegui JJ, Sastre J et al. Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease. Clinical evaluation of a new *in vitro* test system, UniCAP™, in six European allergy clinics. *Allergy* 1998; 53:763-768.
- Stenman U-H. Quantification of antigens. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Immunochemistry and molecular immunology*. 5. ed. Cambridge, Massachusetts, Blackwell Science, 1996; v.1, p. 45.1-45.7.

## Citometria de fluxo

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997; p. 38-65.
- Carter NP. Flow sorting. In: Ormerod MG (ed.). *Flow cytometry – A practical approach*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996; p. 55-65.
- Carter NP, Meyer EW. Introduction to the principles of flow cytometry. In: Ormerod MG (ed.). *Flow cytometry – A practical approach*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996; p. 1-25.
- Deems D, Shiba AM, Ward DM, Young GJ. FACSCount™. The most complete system for measuring absolute CD4, CD8, and CD3 counts. *FACSCount White Paper*, July 1994.
- Esser C, Thiel A, Radbruch A. Parallel cell sorting complementing FACS. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Cell surface and messenger molecules of the immune system*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v. 2, p. 51.1-51.7.
- Hardy RR. Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry. In: Weir DM, Herzenberg LA (eds.). *Handbook of experimental immunology – Immunochemistry*. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986; v.1; p 31.1-31.12.
- Kantor A, Roederer M. FACS analysis of leucocytes. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Cell surface and messenger molecules of the immune system*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v. 2, p. 49.1-49.13.
- Lewis E, Rickman WJ. Methodology and quality control for flow cytometry. In: Rose NR, Macario EC de, Fahey JL et al. (eds.). *Manual of Clinical laboratory Immunology*. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 164-173.
- Loken MR, Wells DA. Immunofluorescence of surface markers. In: Ormerod MG (ed.). *Flow cytometry – A practical approach*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996; p. 67-91.
- Ormerod MG. An introduction to fluorescence technology. In: Ormerod MG (ed.). *Flow cytometry – A practical approach*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996; p. 27-43.
- Ormerod MG. Preparing suspensions of single cells. In: Ormerod MG (ed.). *Flow cytometry – A practical approach*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996; p. 45-54.
- Parks DR. Flow cytometry instrumentation and measurements. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Cell surface and messenger molecules of the immune system*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v.2, p. 47.1-47.12.
- Parks DR, Bigos M. Collection, display, and analysis of flow cytometry data. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Cell surface and messenger molecules of the immune system*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v. 2, p. 50.1-50.11.
- Parks DR, Kantor AB, Roederer M. Overview: Flow cytometry and FACS. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Cell surface and messenger molecules of the immune system*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v.2, p. 46.1-46.2.
- Parks DR, Lanier LL, Herzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. In: Weir DM, Herzenberg LA (eds.). *Handbook of experimental immunology – Immunochemistry*. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1986; v.1, p 29.1-29.21.
- Waggoner A, Seadler A. Fluorescent reagents for flow cytometric analysis. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA et al. (eds.). *Weir's handbook of experimental immunology – Cell surface and messenger molecules of the immune system*. 5. ed. Cambridge/Massachusetts: Blackwell Science, 1996; v.2, p. 48.1-48.9.

## Ensaios multiparamétricos

- Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA. Multiplex detection of IgM and IgG class antibodies to *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, and Cytomegalovirus using a novel multiplex flow immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:1734-1738.



- Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA. Evaluation of three multiplex flow immunoassays compared to an enzyme immunoassay for the detection and differentiation of IgG class antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:253-257.
- Casper JM, Storie JM, Samoy JV et al. Multiplex Immunoassays for the detection of extracellular and intracellular analytes using flow cytometry. Published in December 2009 (p. 5) DOI: 10.2144/000113319.
- Ekins R, Chu F. Developing multianalyte assay. *Trends Biotech* 1994; 12:89-94.
- Ekins R, Chu F. Multianalyte testing. *Clin Chem* 1993; 39:369-370.
- Ekins R, Chu F, Biggart E. Fluorescence spectroscopy and its application to a new generation of high sensitivity, multimicrospot, multianalyte, immunoassay. *Clin Chim Acta* 1990; 194:91-114.
- Ekins R, Chu FW. Multianalyte microspot immunoassay – Microanalytical “compact disk” of the future. *Clin Chem* 1991; 37:1955-1967.
- Fodor SPA, Rava RP, Huang XC et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 1993; 364:555-556.
- Gomez E, Jespersen DJ, Harring JA et al. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow Immunoassay for the detection of IgM- and IgG-class antitreponemal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:966-968.
- Kakabakos SE, Christopoulos TK, Diamandis EP. Multianalyte immunoassay based on spatially distinct fluorescent areas quantified by laser-excited solid-phase time-resolved fluorometry. *Clin Chem* 1992; 38:338-342.
- Kricka L. Multianalyte testing. *Clin Chem* 1992; 38:327-328.
- Kricka L. Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays. *Clin Chem* 1994; 40:347-357.
- Leng SX, McElhaney JE, Walston JD et al. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; 63:879-884.
- Parsons RG, Kowal R, Leblond D et al. Multianalyte assay system developed for drugs of abuse. *Clin Chem* 1993; 39:1899-1903.
- Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G et al. Multiplexed AtheNA multitype immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2005; 38:105-9.
- Vostrý M. Multiplex immunoassays: chips and beads. *The Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Disponível em: [http://www.ifcc.org/media/58888/ejifcc\\_v21\\_03\\_02.pdf](http://www.ifcc.org/media/58888/ejifcc_v21_03_02.pdf). Acesso em: 20 set. 2012.
- Yarnall M. Automation of immunoassays. In: Shan G. *Immunoassays in agricultural biotechnology*. Hoboken: John Wiley, 2011.
- Yu X, Schneiderhan-Marra N, Joos TO. Protein microarrays for personalized medicine. *Clinical Chemistry* 2010; 56:376-387.



## Capítulo 3

---

# Diagnóstico Molecular

*José Eduardo Levi*

■ Referências bibliográficas, 57

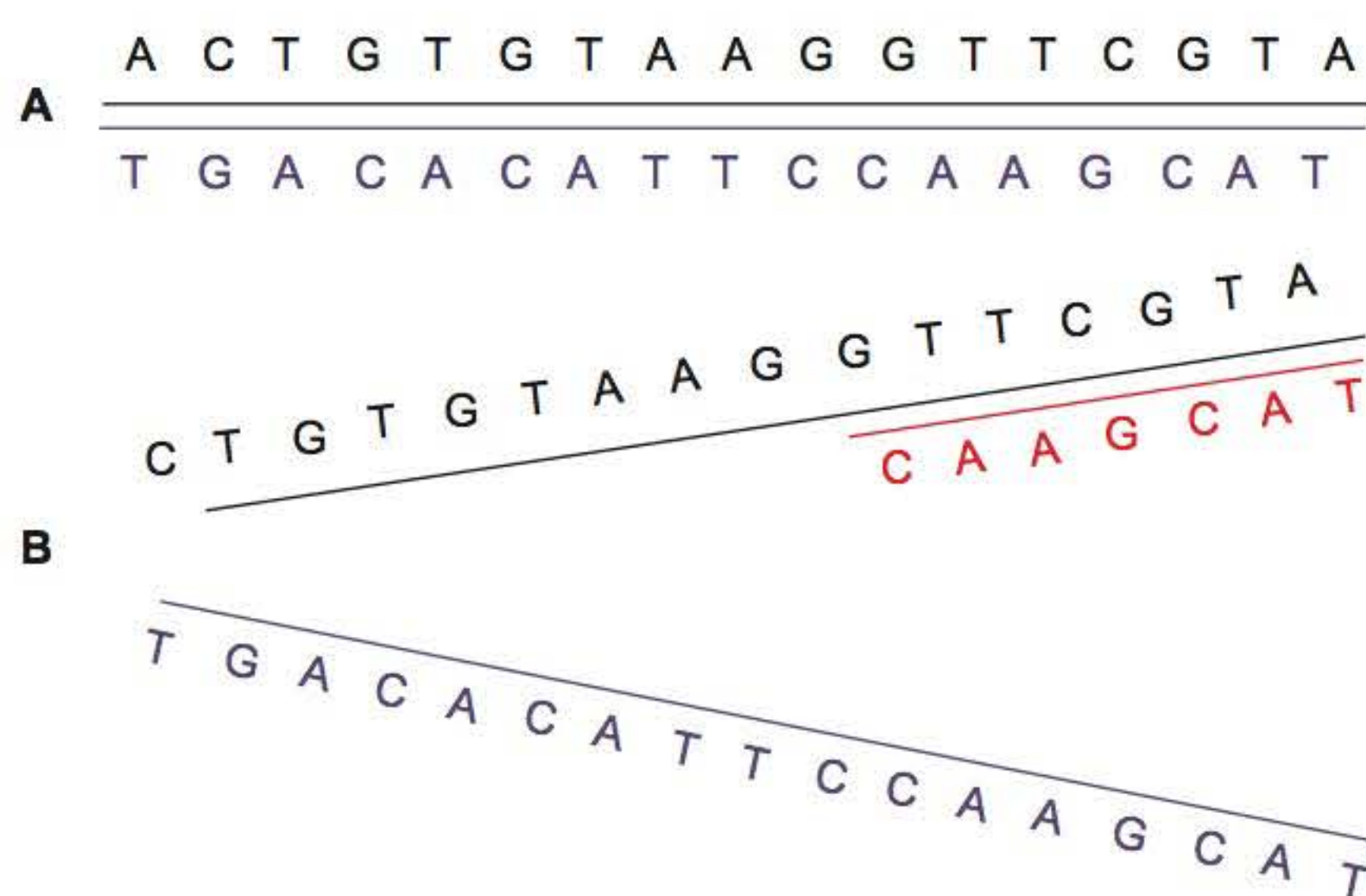


Adenina parecia com timina e citosina parecia com guanina. Esse fato, elucidado experimentalmente por Watson e Crick na década de 1950, contém a explicação bioquímica de como o DNA é capaz de preservar a informação genética, em que *parear* significa estabelecer ligações fracas (pontes de hidrogênio) entre as bases nitrogenadas. Quando o DNA é submetido a temperaturas altas ( $> 90^{\circ}\text{C}$ ) ele desnatura, ou seja, ocorre a quebra das pontes de hidrogênio e as fitas se separam, e, quando há o resfriamento, as fitas voltam a se ligar. Nas células, a separação das fitas, essencial ao processo de cópia e duplicação celular, é feito por enzimas como a helicase. Esse fenômeno da desnaturação reversível forma a base teórica de todos os testes moleculares, que se valem destes dois princípios: complementaridade e desnaturação, ilustrados na Figura 3.1.

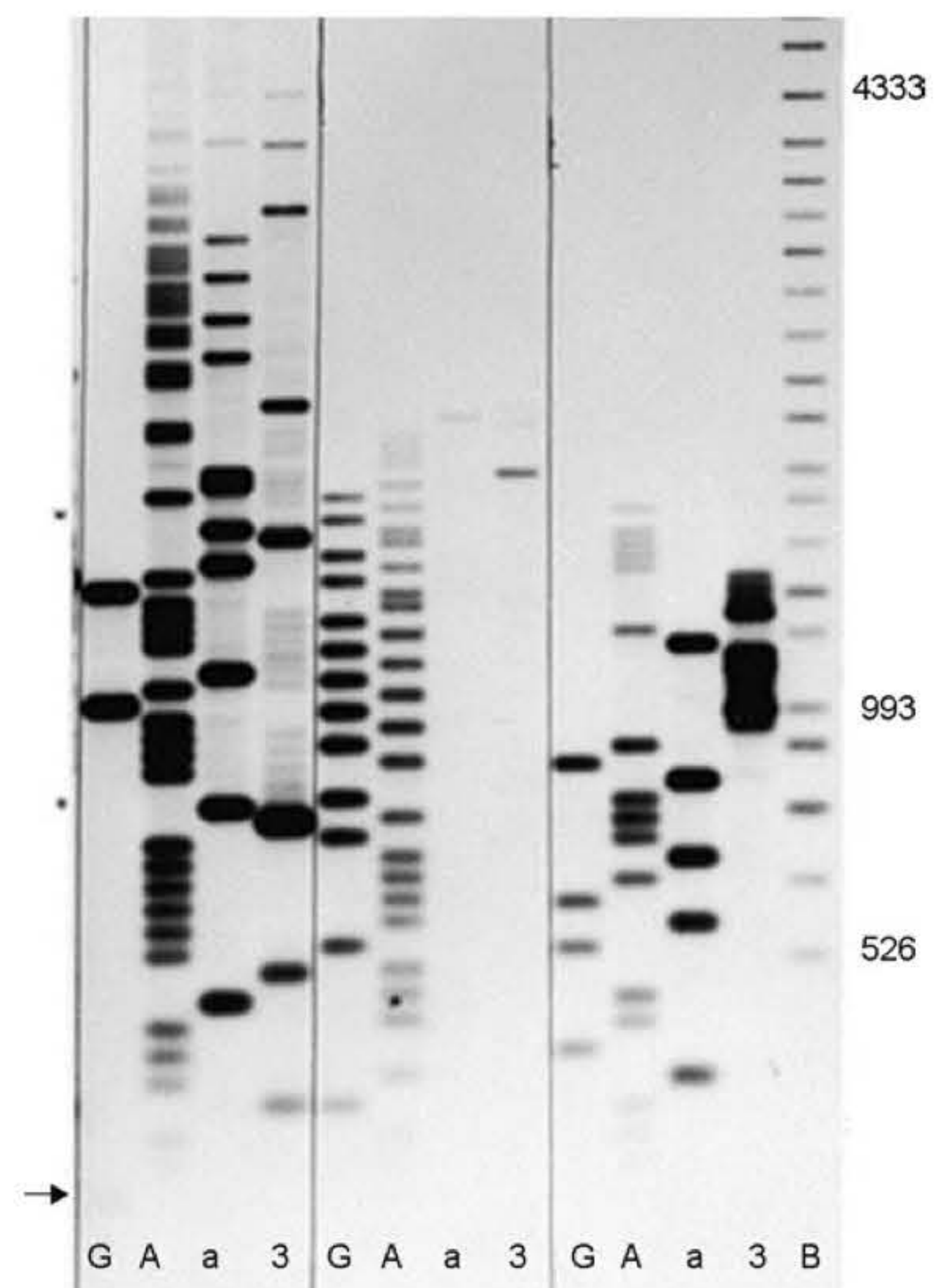
Nas décadas seguintes, a manipulação de ácidos nucleicos foi facilitada pelas técnicas de clonagem, principalmente usando-se as enzimas de restrição, o que permitiu inserir segmentos específicos de DNA em plasmídios bacterianos e replicá-los nas bactérias hospedeiras. A capacidade de “marcar” os ácidos nucleicos com compostos radioativos como o  $^{32}\text{P}$  deu origem às chamadas sondas, que, por meio da desnaturação e hibridização, permitiram os testes moleculares pioneiros para diagnóstico. A primeira dessas técnicas foi batizada como *Southern blot*<sup>1</sup> em homenagem ao seu inventor, o bioquímico inglês Edwin Mellor Southern (Figura 3.2). Quando usada para a detecção de RNA se chama *Northern blot* e, quando aplicada à detecção de proteínas, chama-se *Western blot*.

Essa tecnologia foi inicialmente aplicada na arena diagnóstica para a identificação pessoal e testes de paternidade,<sup>2</sup> substituindo imediatamente as metodologias então empregadas, como a comparação de grupos sanguíneos e os polimorfismos proteicos e de HLA, já que a acurácia é muito superior e importantíssima nesta situação em que é inadmissível conviver com um resultado “indeterminado”.

Na década de 1980 foi inventado o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis,<sup>3</sup> que recebeu por seu feito o Prêmio Nobel de Química em 1993. A PCR revolucionou as ciências biológicas e tornou possível a enorme evolução nas técnicas de clonagem e sequenciamento, que culminaram nos animais e plantas transgênicos e no sequenciamento de genomas completos de diferentes organismos, incluindo o homem (Projeto Genoma Humano).



**Figura 3.1** **A.** Trecho de DNA de dupla fita complementar. **B.** DNA desnaturado, com as fitas separadas e a hibridização de uma sequência complementar à fita preta representando uma sonda ou *primer* (vermelho).



**Figura 3.2** Teste de *Southern blot*. O DNA é submetido à fragmentação com enzima de restrição, depois transferido para uma membrana de nitrocelulose e hibridizado com sondas radioativas ( $^{32}\text{P}$ ). A membrana é exposta a um filme de raios X que é, depois, revelado.

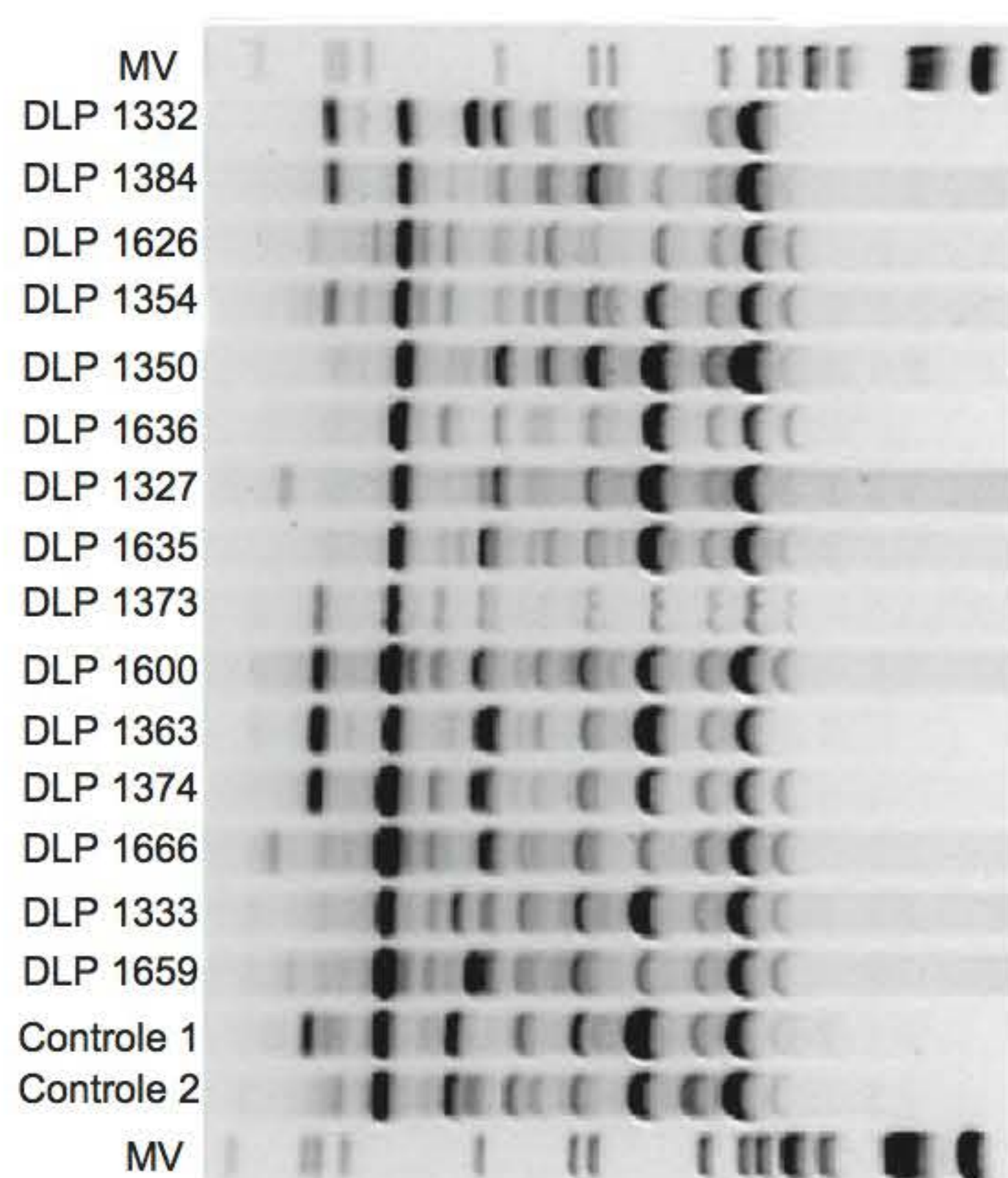
Por sua praticidade e facilidade, diversos métodos com base em PCR passaram a ser desenvolvidos com aplicações específicas, tais como a RT-PCR para alvos RNA e a *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD, Figura 3.3) para investigações de relações epidemiológicas e filogenéticas entre indivíduos.

Na década de 1990 foi demonstrado que a carga viral de HIV era um excelente marcador prognóstico, que pode ser utilizado no monitoramento da eficácia da terapia antirretroviral,<sup>4</sup> impulsionando o surgimento do primeiro teste comercial com base em PCR. Outros testes se seguiram na área das doenças infecciosas, como aqueles voltados para as hepatites B e C, e, logo após, testes para doenças genéticas e importantes aplicações em oncologia, para alguns tumores de base genética conhecida.

Como a PCR produz uma amplificação gigantesca do alvo, da ordem de 1 bilhão de vezes, é uma metodologia muito sensível, detectando quantidades de microrganismos que não eram detectáveis por outros métodos. Organismos de cultivo difícil ou de crescimento lento, que demandam longos períodos em cultura, passaram a ser identificados em horas, o que levou à substituição de tais métodos por técnicas moleculares de amplificação, como a PCR e outras, nos laboratórios diagnósticos.

Diversas metodologias de amplificação foram inventadas, e podem ser divididas entre métodos que amplificam um segmento gênico do alvo e métodos que amplificam um sinal obtido por hibridização. No primeiro grupo estão, entre outras, a PCR, a *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA), técnica que gera RNA como produto<sup>5</sup> em vez





**Figura 3.3** RAPD-PCR de DNA de isolados bacterianos em um surto hospitalar. O perfil de fragmentos gerados aleatoriamente permite inferir relações epidemiológicas e temporais entre as cepas.

de DNA, e a *ligase chain reaction* (LCR), que é muito semelhante à PCR, mas tem como enzima catalisadora uma ligase que acopla oligonucleotídeos justapostos.<sup>6</sup> No segundo grupo estão o *branched DNA* (bDNA)<sup>7</sup> e a captura híbrida.<sup>8</sup> Os métodos que amplificam o material genético em geral apresentam maior sensibilidade, enquanto os que amplificam o sinal são mais vantajosos por terem menor chance de contaminação, uma vez que não ocorre amplificação do alvo. Ambos os grupos de testes são utilizados hoje rotineiramente na patologia clínica. A captura híbrida é o método de referência para o diagnóstico do papilomavírus humano (HPV); o bDNA é usado para a determinação da carga viral das hepatites B e C, além do HIV. Já a PCR é o método utilizado em dezenas de *kits* comerciais, disponíveis para vários agentes infecciosos, como os já citados HBV, HCV e HIV, mas também para citomegalovírus (CMV), muitas outras viroses, infecções bacterianas, fúngicas e por protozoários, além de rearranjos gênicos característicos de algumas neoplasias. Sem dúvida, a altíssima sensibilidade agrega grande valor a esses métodos no manejo clínico. Em muitas situações médicas a informação da ausência de um alvo, abaixo de um limite baixíssimo de detecção, é de suma importância, como na decisão do final de tratamento das hepatites virais e na doença residual mínima oncológica. Por outro lado, esta enorme capacidade de amplificação também é o maior problema com a técnica, uma vez que o produto de amplificação, o *amplicon*, pode ser carregado para as áreas de extração e pré-amplificação do laboratório, por meio de maçanetas, canetas, celulares, roupas etc. Uma amostra com quantidade inicial de mil cópias de um determinado gene terá gerado, ao final da PCR, bilhões de cópias. A necessidade de abrirem-se os tubos de PCR para a separação dos produtos por eletroforese em gel gera aerossol, que poderá espalhar pelo ambiente algumas poucas cópias do *amplicon*, suficientes para contaminar uma próxima reação, o que leva a resultados falso-positivos. Por esta razão, preconiza-se um fluxo unidirecional de trabalho, sempre do ambiente “limpo”

(pré-PCR) para o “sujo” (que contém os *amplicons*), com salas separadas para cada etapa. Igualmente importante é o treinamento dos operadores, que devem respeitar essa característica da reação e evitar o refluxo e o transporte de materiais do pós para o pré-PCR. Engenhosos sistemas químicos de controle dos *amplicons* foram desenvolvidos, tais como a substituição do dTTP pelo dUTP em PCR, levando à síntese de produtos de PCR com o nucleotídeo uracila incorporado, que é passível de degradação por uma enzima que reconhece DNA contendo U, a uracila DNA glicosilase.<sup>9</sup>

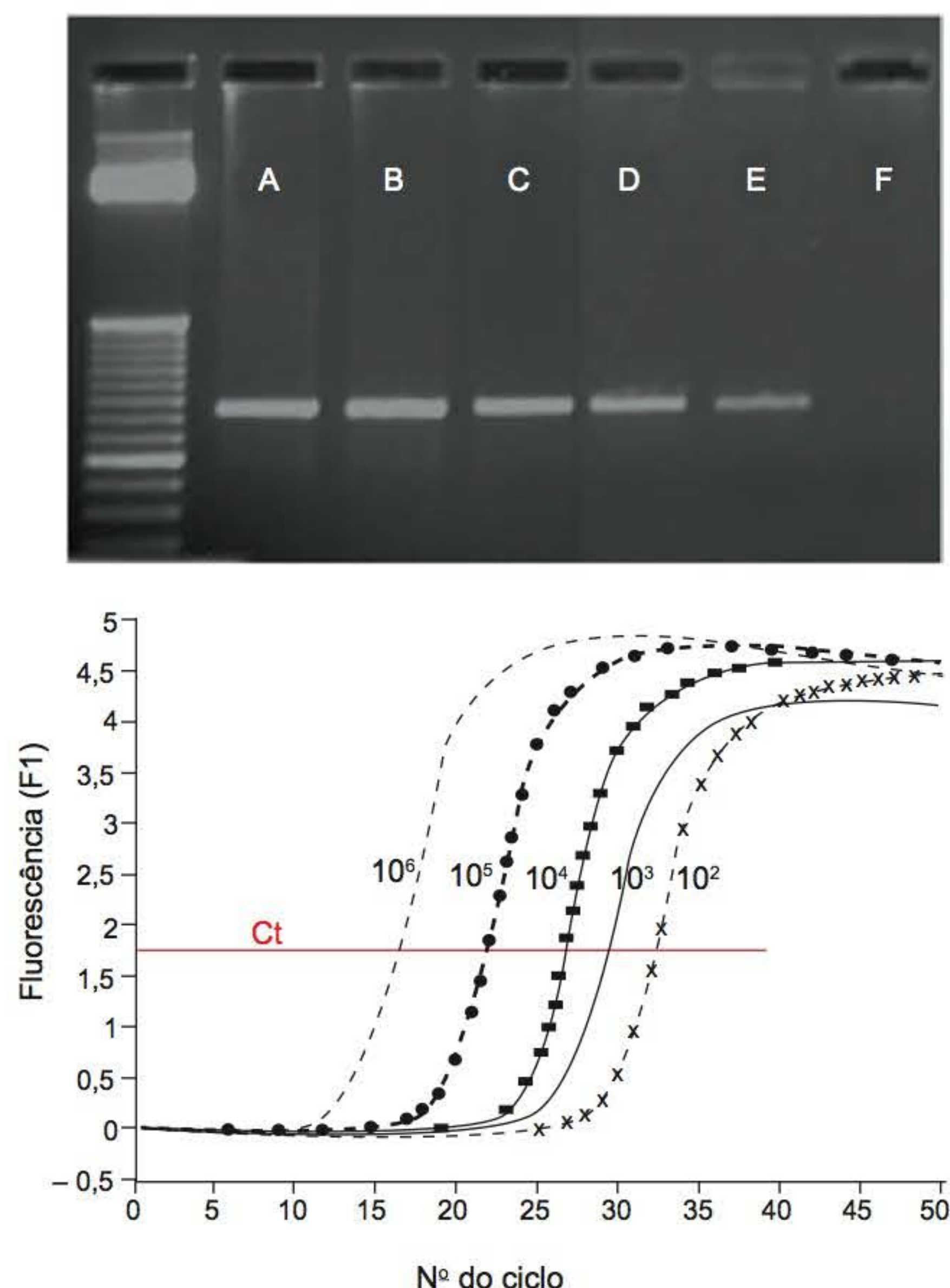
Afora a sensibilidade, os métodos moleculares apresentam uma segunda característica marcante que os diferencia de qualquer outra família de metodologias laboratoriais: a versatilidade. Uma vez que os ácidos nucleicos estão presentes em todo material biológico celular, e muitas vezes também de forma residual, mas analisável, em fluidos acelulares como o liquor, a urina e o plasma, é possível realizar a análise molecular a partir de qualquer fonte biológica. Além de transformar o laboratório clínico, cuja área de biologia molecular vem crescendo e ocupando aquelas anteriormente destinadas a formas tradicionais de diagnóstico, como cultura de células e bacteriana, sorologia e citologia, outras áreas do conhecimento sofreram enorme impacto com a introdução da PCR, como a paleontologia e a história. Resíduos de DNA foram amplificados a partir de insetos preservados em âmbar por milhões de anos, de fragmentos de tecidos de múmias, entre muitas diferentes fontes, o que permitiu a obtenção de novos dados de origem e evolução das espécies, o reconhecimento da história de patógenos e até mesmo o sonho de recriarem-se espécies extintas, ilustrado pelo conhecido livro/filme *Jurassic Park*.

Uma importante evolução recente da PCR é a possibilidade de observação e registro, em tempo real, da formação do produto por meio de sensores que detectam a fluorescência emitida por cada tubo/poço de PCR a cada ciclo, o que foi denominado PCR em tempo real. Os termocicladores recebem um módulo que contém as unidades que captam a fluorescência e transformam este sinal luminoso em eletrônico para o computador. Assim, não é necessário abrir os tubos após a reação, o que diminuiu muito o problema de contaminação já apontado. Por ser possível medir a quantidade de fluorescência, em última análise proporcional à quantidade inicial de alvo, na fase exponencial de amplificação, a PCR em tempo real é uma técnica quantitativa, enquanto a PCR convencional é um método que analisa apenas o ponto final (Figura 3.4).

Uma vez eliminada a necessidade de realização da análise por eletroforese em gel, procedimento artesanal e de baixa capacidade de *throughput* (processividade), a automação dos métodos moleculares tornou-se factível. No entanto, a etapa de extração de ácidos nucleicos mostrou-se a mais desafiadora tecnologicamente. No momento de finalização deste livro, em 2012, já havia muitos modelos e equipamentos que faziam extração automatizada de um grande número de amostras simultaneamente. Porém, esses equipamentos manipulavam volumes de amostras muitas vezes maior do que aquele de fato utilizado nas análises. Colhia-se um tubo de 5 mL de sangue do paciente, do qual eram retirados 100 a 500 µL para a extração, dos quais seria empregado apenas o equivalente a 1 a 5 µL na reação de amplificação. Isso significa que ainda não avançamos suficientemente no processo de miniaturização desta etapa, problema refletido no tamanho dos equipamentos disponíveis. Além de grandes e pesados, costumam ser lentos, tomando 2 a 4 h apenas para a etapa de extração.

Ainda assim, o acoplamento dessas plataformas com as plataformas de amplificação/detecção em tempo real, ocorrido nos últimos anos, culminou no aparecimento de métodos 100%





**Figura 3.4** Ilustração explicativa da deficiência da PCR convencional para a quantificação absoluta de genomas. A parte superior da figura mostra um gel de produtos de amplificação de quantidades iniciais decrescentes do vírus da hepatite B (A =  $10^6$  cópias/mL; B =  $10^5$  cópias/mL; C =  $10^4$  cópias/mL; D =  $10^3$  cópias/mL; E =  $10^2$  cópias/mL; F = controle negativo). A parte inferior mostra a mesma reação realizada em PCR em tempo real, quando, na etapa exponencial, é possível distinguir as amostras com maior carga viral das de menor carga viral por meio do valor de Ct (*cycle threshold*). Já na análise visual do gel as amostras A, B e C são indistinguíveis, embora apresentem diferença de 10.000 vezes na concentração de HBV.

automatizados. Provavelmente, o exemplo aplicado hoje em maior escala é o dos chamados testes NAT (*nucleic acid tests*) usados na triagem de doadores de sangue para HBV, HCV e HIV para evitar a transmissão desses agentes por doadores em janela imunológica quando o teste sorológico com base em anticorpos é negativo.<sup>11</sup> Outro exemplo em vias de implantação é o uso de plataformas semelhantes para o rastreio do câncer cervical com testes que detectam o DNA/RNA dos HPV, presentes em 100% dos casos de câncer do colo uterino, em substituição aos testes de citologia oncológica (Papanicolaou).<sup>12</sup>

A nanotecnologia trouxe a promessa de miniaturização das três etapas (extração-amplificação-deteção). Começam a surgir dispositivos diminutos utilizando minúsculas bombas que fazem os reagentes fluírem através de microcanais esculpidos em lâminas e outros substratos, o que resulta de fato no conceito de *lab in a chip*, semelhante aos testes rápidos imunocromatográficos existentes. Esses testes poderão se tornar uma alternativa para o diagnóstico molecular no chamado *point-of-care*, ou seja, que pode ser feito no consultório médico ou mesmo em casa.<sup>13</sup>

Outra linha de evolução dos testes moleculares fundamenta-se no sequenciamento de ácidos nucleicos. Com a explosão dos métodos de sequenciamento, só possível pelo uso da PCR, esta técnica, antes extremamente artesanal e laboriosa, tornou-se

um procedimento simples e de rápida execução. Hoje a lei de Moore da informática é válida também para o sequenciamento, ou seja, a cada 2 anos há um salto no rendimento no número de bases obtido em uma corrida de sequenciador, realizado em plataformas também semi ou totalmente automatizadas. Com o conhecimento das sequências genômicas de inúmeros organismos e microrganismos, e a existência de bancos contendo essas informações acessíveis pela Internet, o diagnóstico das doenças infecciosas passará, em breve, a ter uma abordagem totalmente diferente daquela que praticamos nos últimos cem anos. Em vez de se criar uma hipótese diagnóstica com base em sintomas, dados clínicos e epidemiológicos, será feito um sequenciamento de todo o material genético contido em uma determinada amostra, e o *software* do sequenciamento nos informará quais microrganismos conhecidos e desconhecidos estão nela presentes.<sup>14</sup> Tal abordagem já se mostrou eficiente na elucidação, em uma rapidez jamais imaginada, do agente etiológico associado ao surto de uma cepa muito agressiva de *E. coli* que causou vários óbitos na Alemanha.<sup>15</sup> Assim, prevê-se que, em um futuro próximo, todo o arsenal hoje utilizado nos testes moleculares, como as sondas, os compostos fluorescentes que magnificam o sinal, as enzimas de restrição e outros se tornarão obsoletos, pois visam, em última análise, identificar e/ou quantificar o agente infeccioso de uma amostra por meio do reconhecimento de assinaturas genéticas dele, o que será obtido diretamente pelo sequenciamento. Obviamente este admirável mundo novo traz implicações éticas importantes, uma vez que muitas informações sobre o genoma do hospedeiro serão obtidas em concomitância, o que levantará dúvida de como lidar com elas.

## Referências bibliográficas

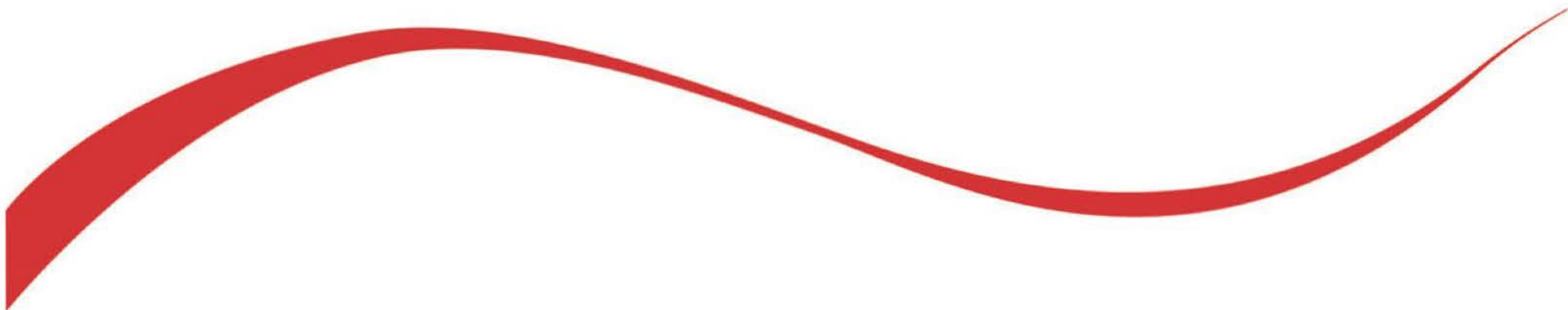
1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 1975; 98:503-517.
2. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985; 316:76-79.
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F *et al.* Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
4. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P *et al.* Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167-1170.
5. Romano JW, van Gemen B, Kievits T. NASBA: a novel, isothermal detection technology for qualitative and quantitative HIV-1 RNA measurements. *Clin Lab Med* 1996; 16:89-103.
6. Barany F. The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl* 1991; 1:5-16.
7. Nolte FS. Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. *Adv Clin Chem* 1998; 33:201-235.
8. Lörincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23:707-730.
9. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93:125-128.
10. Pääbo S, Poinar H, Serre D *et al.* Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 2004; 38:645-679.
11. Roth WK, Busch MP, Schuller A *et al.* International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang* 2012; 102:82-90.
12. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L *et al.* Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012; 13:78-88.
13. Curtis KA, Rudolph DL, Nejad I *et al.* Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *PLoS One* 2012; 7(2):e31432.
14. Su Z, Ning B, Fang H *et al.* Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2011; 11:333-343.
15. Rohde H, Qin J, Cui Y *et al.* *E. coli* O104:H4 Genome Analysis Crowd-Sourcing Consortium. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med* 2011; 365:718-724.







## Seção 2 | Vírus





- Capítulo 4 | Citomegalia, 61
- Capítulo 5 | Dengue, 69
- Capítulo 6 | Hepatites Virais, 73
- Capítulo 7 | Infecção por HIV, 97
- Capítulo 8 | Infecção por HPV, 113
- Capítulo 9 | Infecção por HTLV-I e HTLV-II, 120
- Capítulo 10 | Mononucleose Infecciosa, 135
- Capítulo 11 | Rubéola, 142



## Capítulo 4

---

# Citomegalia

*Cláudio Sérgio Pannuti*

- Introdução, 62
- Características do vírus, 62
- Aspectos clínicos e epidemiológicos, 62
- Diagnóstico laboratorial, 63
- Correlação clínico-laboratorial, 65
- Referências bibliográficas, 67



## ► Introdução

O citomegalovírus (CMV) tem sido considerado um dos principais causadores de doenças no homem. O risco de infecção por esse agente começa já na vida intrauterina e no período perinatal, podendo ocorrer também como infecção adquirida na infância ou na idade adulta. Estudos soropidemiológicos demonstram que até 85% da população adulta no estado de São Paulo já foi infectada pelo CMV.<sup>1,2</sup> Além disso, esse vírus tem a capacidade de ficar latente no organismo humano, reativando-se na vigência de doenças imunodepressoras.

## ► Características do vírus

O CMV está incluído na família Herpesviridae, subfamília  $\beta$ -herpesvirinae. É um DNA vírus, de simetria icosaédrica, com 162 capsômeros, envolvidos por um envelope lipídico. Sua vida média a 37°C é de apenas 45 min. Além de infectar o homem, os citomegalovírus são encontrados no mundo animal em camundongos, cobaias e macacos, mas essas cepas são espécie-específicas, de modo que os CMV de animais não infectam o homem. As eventuais diferenças antigênicas observadas no CMV humano não são suficientes para caracterizar subtipos do CMV.<sup>3</sup>

## ► Aspectos clínicos e epidemiológicos

### ▪ Infecção congênita

O CMV é considerado a causa mais comum de infecção congênita no homem. Diferentes estudos têm apresentado taxas de infecção variando de 0,2 a 2,2%,<sup>2</sup> admitindo-se que só nos EUA nascem, a cada ano, cerca de 40.000 crianças infectadas congenitamente.<sup>4</sup> Estudos realizados em uma mesma área geográfica demonstraram que a incidência de infecção congênita pelo CMV é pelo menos duas vezes maior nas populações de baixo nível socioeconômico – justamente as com maior prevalência de anticorpos. Em São Paulo, demonstraram-se taxas variando de 0,49 a 0,98%, dependendo do nível socioeconômico da população estudada.<sup>2</sup> A explicação para as altas taxas de infecção congênita pelo CMV e para a relação entre incidência de infecção congênita e nível socioeconômico da população encontra-se na capacidade que o CMV tem de infectar o feto mesmo quando a mãe já apresentava anticorpos antes da concepção, ao contrário do que ocorre com a rubéola e a toxoplasmose.<sup>5</sup> A análise do DNA das cepas de CMV isoladas de casos em que se documentou infecção congênita em duas gestações sucessivas sugerem que o mecanismo fundamental envolvido na infecção intrauterina de mães previamente imunes é a reativação do vírus latente da mãe. É importante ressaltar, porém, que a absoluta maioria dos recém-nascidos (RN) que vêm ao mundo com sintomas de doença congênita são de mães que tiveram infecção primária durante a gestação. Desse modo, os anticorpos maternos acabam desempenhando importante efeito protetor no feto, pois ainda que os mesmos não impeçam a ocorrência da infecção congênita, impedem que a doença se manifeste clinicamente. Estudo prospectivo analisando 197 RN com infecção congênita pelo CMV revelou que somente as crianças cujas mães tiveram infecção primária durante a gestação apresentaram sintomas ao nascimento

(18%). Nesse grupo, após acompanhamento médio de 5 anos, 25% das crianças apresentaram uma ou mais sequelas. Por outro lado, embora todas as crianças infectadas congenitamente por reativação de infecção materna fossem assintomáticas ao nascerem, 8% desenvolveram sequelas.<sup>6</sup>

A infecção pode ocorrer em qualquer época da gestação. Embora estudos experimentais em cobaias tenham demonstrado que a gravidade da infecção é maior quando a infecção materna ocorre no início da gestação, no homem, essa relação não está estabelecida, já que a maioria absoluta das infecções maternas são assintomáticas.

A forma mais grave, originalmente denominada “doença de inclusão citomegálica” caracteriza-se clinicamente por icterícia, hepatoesplenomegalia, petéquias, microcefalia, coriorretinite e calcificações cerebrais. A absoluta maioria dos RN com essa apresentação clínica irão desenvolver sequelas graves na evolução, incluindo surdez, perda da visão, retardo mental e déficits neurológicos. Felizmente, somente 1 a 2% dos RN infectados apresentam essa forma clínica. Entre os extremos representados por recém-nascidos totalmente assintomáticos e a forma mais grave da doença, existe um amplo espectro de manifestações clínicas, por exemplo, a ocorrência isolada de hepatoesplenomegalia, com ou sem icterícia, ou de petéquias, ou a combinação desses sintomas. De modo geral, as crianças com quadro clínico mais leve têm maiores chances de evoluir sem sequelas tardias.

### ▪ Infecção perinatal

O CMV também pode infectar o recém-nascido durante o trabalho de parto, pelo contacto dele com secreções uterinas maternas contaminadas pelo CMV durante sua passagem pelo canal de parto, ou nas primeiras semanas de vida, pela contaminação com leite materno contendo CMV.<sup>7,8</sup> A incidência de infecção perinatal tem variado nos diversos estudos, de 7 a 38%. Em São Paulo, estudo prospectivo realizado em um hospital público revelou que o risco de infecção foi de 24,3%, situando-se entre os mais altos do mundo.<sup>9</sup> As taxas de infecção dependem das taxas de excreção do CMV em cervice uterina no momento do parto, ou leite materno nas primeiras semanas de amamentação. Em ambos os casos, a possibilidade de ocorrer infecção do RN quando a mãe é excretora do vírus é de cerca de 50%. Em estudo realizado em São Paulo, isolou-se o CMV de 29,8% das amostras de leite obtidas de puérperas assintomáticas.<sup>10</sup>

O período de incubação da infecção perinatal é estimado entre 4 a 12 semanas, sendo em média de 8 semanas. Esse tipo de infecção, embora muito frequente, é, em geral, totalmente assintomático, embora raros relatos de pneumonites deem conta de certa gravidade.

### ▪ Infecção adquirida

Após o período neonatal, a infecção se dá por transmissão horizontal do vírus, por meio de secreções que o contenham. A urina e a saliva são as fontes mais importantes de disseminação do CMV, por isso as taxas de infecção adquirida costumam ser muito altas em berçários e creches devido ao contato íntimo entre crianças excretoras e crianças suscetíveis. Do mesmo modo, em populações de nível socioeconômico mais baixo, como consequência das condições adversas de higiene e moradia, a infecção é mais precoce e frequente. Existem evidências de que a transmissão do CMV também possa ocorrer por via sexual, já que excreção viral frequente e prolongada do



vírus no sêmen é frequentemente observada, além de ter-se documentado a presença de cepas geneticamente idênticas no sêmen e secreções uterinas de parceiros sexuais.<sup>11</sup>

A maioria absoluta das infecções adquiridas é assintomática. Entretanto, quando ocorrem manifestações clínicas, estas assumem características de um quadro de mononucleose infecciosa-“símile”.<sup>12</sup> O paciente apresenta quadro febril prolongado (na maioria das vezes com 10 dias ou mais de duração), sensação de fraqueza, sudorese, e, eventualmente, hepatoesplenomegalia. Ao contrário do que acontece na mononucleose infecciosa clássica, provocada pelo vírus Epstein-Barr, a presença de linfonodomegalia cervical é rara no adulto com citomegalomononucleose. Contudo, na infância, a linfonodomegalia cervical é comum, ocorrendo em cerca de 90% dos casos.<sup>13</sup>

Laboratorialmente, o que chama mais atenção é o hemograma com linfocitose relativa e absoluta importante, bem como a presença de grande número de linfócitos atípicos. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) estão moderadamente elevadas em cerca de 80% dos casos.<sup>13</sup>

### ▪ Citomegalovírus no paciente imunocomprometido

A grande expansão da técnica de transplante de órgãos (rim, coração, fígado, medula óssea), a introdução de novos quimioterápicos para tratamento de neoplasias, bem como o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) teve como consequência o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, passíveis de sofrerem infecções oportunistas, como é o caso do CMV. Embora possa ocorrer infecção primária, a maioria das infecções pelo CMV no paciente imunocomprometido se devem à reativação de uma infecção latente, previamente existente.

Hoje, admite-se que de 70 a 90% dos receptores de transplante renal irão apresentar, em algum momento do pós-operatório, evidências de infecção pelo CMV, podendo, de modo geral, estender-se essa projeção para os outros tipos de transplante.<sup>14,15</sup> Do mesmo modo, nos pacientes com AIDS, é frequente a detecção de infecção ativa (ou seja, evidências laboratoriais de replicação viral) durante a evolução da doença. Estudo realizado em São Paulo demonstrou que, durante período médio de acompanhamento de 2 meses, 30/50 (60%) dos pacientes com AIDS internados por qualquer causa em dois hospitais públicos de São Paulo apresentaram evidências de infecção ativa pelo CMV.<sup>16</sup> Muitos dos pacientes imunodeprimidos que venham a apresentar infecção ativa pelo CMV irão apresentar também sintomas e sinais de doença por esse vírus. As manifestações mais comumente observadas são quadros febris prolongados com alterações hematológicas ou hepáticas (também conhecidos como “síndrome do citomegalovírus”), de grande incidência em transplantados renais, quadros de pneumonia intersticial (mais comum em receptores de transplante de medula), retinite e úlceras gastrintestinais, ambas com ampla prevalência em pacientes com AIDS. São doenças que preocupam bastante pela gravidade e, muitas vezes, se não forem tratadas rápida e adequadamente, levam o paciente a óbito.<sup>17</sup>

## ► Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV pode ser feito por diferentes métodos, que incluem exame direto de amostras (por microscopia eletrônica, demonstração de célu-

las com corpúsculos de inclusão característicos, e detecção de antígenos ou DNA viral), isolamento viral em culturas celulares, e vários testes sorológicos.

Para cada apresentação clínica, há necessidade de se escolher este ou aquele recurso laboratorial. Além disso, a escolha do teste a ser utilizado vai depender da experiência do laboratório executante com determinada técnica, da disponibilidade de equipamentos, do custo, e da necessidade ou não de um resultado rápido.

Os testes atualmente disponíveis para detecção de infecção pelo CMV são descritos a seguir.

### ▪ Pesquisa direta

#### *Microscopia eletrônica*

Por meio da pseudorréplica, a microscopia eletrônica tem sido empregada para detectar CMV em amostras de urina e secreções de orofaringe em recém-nascidos.<sup>18</sup> A vantagem desse método é a rapidez, pois poderia dar um resultado positivo em 15 a 30 min, além de poderem-se examinar materiais eventualmente contaminados por fungos ou bactérias, que não são apropriados para isolamento viral. Contudo, além de necessitar de equipamento sofisticado e caro, bem como pessoal altamente treinado, tem sensibilidade relativamente baixa, detectando o CMV apenas em amostras com altas concentrações virais. Não se trata de um exame usado na rotina.

#### *Exame histopatológico e citológico*

O CMV leva, *in vivo*, à formação de células grandes, com inclusões intranucleares (e, eventualmente, citoplasmáticas) características, e podem ser facilmente visualizadas quando coradas com hematoxilina-eosina, Papanicolaou, ou Giemsa. As células de inclusão citomegálica podem ser demonstradas em fragmentos de tecidos (fígado, rim, pulmão etc.), em sedimento urinário, lavado gástrico e broncoalveolar, dentre outros materiais. Quando presentes, têm considerável valor diagnóstico. As grandes vantagens dessa técnica são sua simplicidade, rapidez e baixo custo, podendo ser executada em qualquer laboratório. Contudo, a alta incidência de resultados falso-negativos limita muito seu uso, devendo, por isso, ser complementada com outras técnicas mais sensíveis.<sup>19</sup>

#### *Imuno-histoquímica e imunocitologia*

O advento de anticorpos monoclonais para diversas proteínas do CMV contribuiu muito para o progresso do diagnóstico laboratorial das citomegaloviroses, permitindo a detecção de antígenos específicos em fragmentos de tecidos obtidos por biopsia, ou em necropsia, e em amostras de urina, lavado broncoalveolar, bem como em preparações de leucócitos.<sup>20-24</sup> Esse método é mais sensível que o exame histopatológico comum, e essa característica fica ainda mais latente quando se usam misturas de monoclonais, dirigidos a diferentes epitopos do CMV.<sup>23</sup> A revelação pode ser feita por imunofluorescência ou por técnicas imunoenzimáticas. Embora seja rápida e relativamente simples, é considerada menos sensível que o isolamento viral clássico.<sup>19</sup>

#### *Detecção do antígeno pp65 em neutrófilos (antigenemia)*

Embora a demonstração direta ou indireta da presença do vírus no órgão acometido seja o melhor meio de comprovar laboratorialmente a participação do CMV naquele determinado quadro clínico, muitas vezes não se dispõe de biopsias



para executar essa pesquisa. Uma alternativa para esses casos é a pesquisa do CMV no sangue, pois foi demonstrado em receptores de transplante de medula óssea e também em outros tipos de transplante que existe uma boa correlação entre viremia positiva e doença invasiva pelo CMV.<sup>24</sup> Entretanto, o isolamento do vírus por técnica clássica não é de utilidade, pois pode demorar até 4 semanas para dar essa informação, inviabilizando qualquer tipo de intervenção para prevenção da doença invasiva. Por essa razão, emprega-se, nesses casos, uma técnica rápida. Dentre essas técnicas, encontra-se a pesquisa direta do antígeno pp65 do CMV em neutrófilos circulantes com anticorpos monoclonais (técnica da antigenemia). Além de ser altamente específica, permite a quantificação dos neutrófilos contendo o antígeno do CMV no seu interior<sup>25,26</sup> e tem sido amplamente utilizada, tanto em centros de transplante de células-tronco hematopoéticas como de órgãos sólidos.

### **Reação em cadeia da polimerase | Polimerase em tempo real**

Essa reação ganhou grande impulso nos últimos anos por ser extremamente sensível, permitindo detectar quantidades muito pequenas de DNA viral em amostras clínicas. Tem sido utilizada em amostras de urina,<sup>27</sup> leucócitos periféricos,<sup>28</sup> fragmentos de tecidos<sup>29</sup> e amostras de lavado broncoalveolar,<sup>30</sup> contudo, ainda não pode ser considerada um exame de rotina, pois sua execução é complexa, e sua aplicação clínica ainda não está totalmente definida. Isso ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos, os quais, frequentemente, apresentam infecção ativa pelo CMV, que pode ou não vir acompanhada de doença invasiva. Como existe uma relação entre carga viral e presença de doença clinicamente manifesta e reação em cadeia da polimerase (PCR) pode detectar quantidades mínimas de vírus, frequentemente esse exame apresenta resultado positivo em indivíduos que não têm doença pelo CMV, fazendo com que seu valor preditivo positivo para doença invasiva seja relativamente baixo.<sup>28,30-32</sup> A utilização de PCR em combinação com outras técnicas e, principalmente, o desenvolvimento de técnicas capazes de quantificar o DNA viral presente nas amostras testadas, como a PCR em tempo real,<sup>29,33-35</sup> apresentam-se como a melhor alternativa para o diagnóstico rápido, sensível e específico da citomegalovirose em pacientes imunocomprometidos atualmente.

### **■ Isolamento do citomegalovírus em culturas celulares**

O isolamento do CMV em culturas, por sua alta especificidade e boa sensibilidade, continua sendo uma técnica fundamental para o diagnóstico desse tipo de infecção.<sup>19</sup> O vírus pode ser isolado a partir de diferentes materiais, tais como urina, secreções de orofaringe, sangue, sêmen e fragmentos de órgãos obtidos por biopsia ou necropsia.

Após a coleta, o material deve ser encaminhado no menor tempo possível ao laboratório, em meio de transporte adequado (solução salina balanceada, com soro fetal bovino e antibióticos). Urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) não precisam de meio de transporte, e as amostras de sangue para detecção de viremia só necessitam de anticoagulante. Desde a coleta até a inoculação no laboratório, o material deve ser conservado a 4°C ou em banho de gelo. O material nunca deve ser congelado a -20°C pela grande labilidade do CMV nessa temperatura. Os fibroblastos humanos constituem-se na única linhagem celular que permite sua replicação *in vitro*, e o apa-

recimento de efeito citopático característico, que possibilita a detecção da presença do vírus na cultura, pode demorar até 4 semanas para aparecer, sendo este um dos principais óbices em relação à sua aplicação clínica.

### **Técnica do shell-vial**

Basicamente, consiste em um isolamento viral clássico no qual diferentes materiais clínicos são inoculados em três lâminulas contendo fibroblastos humanos em cultura. Contudo, para aparecimento do efeito citopático característico do CMV, adiciona-se a essas lâminulas uma mistura de anticorpos monoclonais, em intervalos de 24, 48 e 72 h, contra diferentes antígenos do vírus, sendo a revelação feita por meio da imunofluorescência indireta.<sup>36,37</sup> Assim, chega-se ao resultado de uma cultura viral em poucos dias, motivo pelo qual o método é empregado com frequência quando é necessário um diagnóstico rápido, como ocorre em pacientes imunodeprimidos.

### **■ Pesquisa de anticorpos**

Existem vários testes disponíveis para o diagnóstico sorológico das infecções por CMV. A escolha do teste depende basicamente do tipo de informação que se quer buscar, mas o custo, a necessidade de equipamentos, o tempo de execução e a facilidade de execução sempre devem ser levados em consideração.

### **Fixação do complemento**

Durante muitos anos, a reação de fixação do complemento (RFC) foi o único teste disponível para detectar anticorpos anti-CMV. A RFC foi amplamente usada para estudos soropidemiológicos<sup>38</sup> e para o diagnóstico de infecção adquirida (citomegalomononucleose), a partir da ascensão de títulos entre a fase aguda e a convalescença. Nesse último caso, o nível máximo de anticorpos só é atingido de 4 a 6 semanas após o início do quadro clínico.

Embora não exija equipamentos dispendiosos, e se disponha de reagentes comerciais, é um método que exige padronização muito rígida, técnicos altamente treinados, sendo também um pouco demorado. Além disso, a RFC é menos sensível que outros métodos disponíveis para detecção de anticorpos anti-CMV, sendo, por essa razão, cada vez menos usada na rotina.<sup>19</sup>

### **Aglutinação passiva de partículas de látex**

Nesse método, partículas de látex são revestidas com antígenos do CMV e aglutinadas na presença de anticorpos específicos. A leitura é feita por inspeção visual, e a reação completa pode ser feita em 15 min, já que não exige lavagens, longas incubações ou tratamentos adicionais. Trata-se de método bastante sensível e específico.<sup>39,40</sup> Analogamente à RFC, pode ser utilizado para inquéritos soropidemiológicos, triagem de doadores de sangue ou aumento do título de anticorpos em amostras pareadas de sangue.<sup>39-41</sup>

### **Reação de imunofluorescência indireta**

Tem como grande vantagem a possibilidade de permitir a detecção separada de anticorpos IgM.<sup>42</sup> Esse teste exige a manutenção de fibroblastos humanos em cultura no laboratório, que são inoculados com cepa padrão do CMV (em geral, a cepa AD169). Quando aparece efeito citopático característico, as células são fixadas em acetona e utilizadas para pesquisa dos anticorpos.



A pesquisa de anticorpos IgM pode ser empregada para o diagnóstico de infecções congênitas, já que estes não cruzam a barreira placentária, sendo também extremamente útil para diagnosticar quadros de infecção primária pelo CMV (citomegalomononucleose) em pacientes imunocompetentes.

### Testes imunoenzimáticos

Os ensaios imunoenzimáticos, principalmente o ELISA, têm substituído os métodos tradicionalmente usados para detecção de anticorpos anti-CMV nos últimos anos. Apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes às da imunofluorescência indireta,<sup>43</sup> mas têm como vantagem a possibilidade de permitir o processamento de grande número de amostras.

O teste é feito utilizando-se placas plásticas com cavidades revestidas com antígenos purificados do CMV. O soro do paciente é adicionado a essas cavidades, e os anticorpos IgG ou IgM anti-CMV, se presentes, ficarão ligados aos antígenos. A revelação é feita com anticorpos anti-imunoglobulina humana anti-IgG ou IgM (dependendo do tipo de anticorpo que se quer pesquisar), conjugados a enzimas, e o respectivo substrato da enzima utilizada. A intensidade da cor que se desenvolve com a reação enzima-substrato depende da quantidade de enzima presente, que, por sua vez, depende da quantidade de anticorpos, sendo a leitura feita com um espectrofotômetro. Existem diferentes *kits* comercialmente disponíveis, e o resultado pode ser dado em poucas horas.

## ► Correlação clínico-laboratorial

### ▪ Infecção congênita

Classicamente, o teste de eleição para diagnóstico de infecção congênita pelo CMV é o isolamento do vírus na urina,<sup>44</sup> embora possa ser isolado da orofaringe e outros fluidos. A excreção viral é prolongada, podendo durar meses ou mesmo anos. Para se ter certeza de que a infecção é congênita e não perinatal, o isolamento deve ser feito nas 2 primeiras semanas de vida. Os fibroblastos humanos constituem a única linhagem celular que permite a replicação e identificação do CMV *in vitro*; o aparecimento do efeito citopático característico pode demorar até 4 semanas, sendo este um dos principais obstáculos para o uso rotineiro dessa técnica. O *shell-vial* representa uma alternativa mais rápida de diagnóstico, sendo sua sensibilidade semelhante ao isolamento clássico.<sup>36</sup> Contudo, mais recentemente, o PCR tem substituído o isolamento viral por apresentar sensibilidade semelhante com a vantagem de permitir um diagnóstico mais rápido que o isolamento viral. Além disso, a determinação de DNA do CMV por PCR no sangue do RN ao nascimento parece ser tão sensível e específica quanto a PCR da urina para o diagnóstico de infecção congênita pelo CMV.<sup>28</sup>

A pesquisa de anticorpos IgG não tem grande aplicação devido à passagem passiva de anticorpos IgG maternos pela placenta. Por outro lado, a persistência desses anticorpos ou o aumento do título dos mesmos durante os meses seguintes sugere infecção congênita. No entanto, nesse caso fica difícil excluir a possibilidade de infecção perinatal. À medida que os anticorpos maternos passivos fossem desaparecendo, surgiriam os anticorpos produzidos pelo RN ao sofrer infecção no momento do parto ou nas semanas imediatamente seguintes. Como os anticorpos IgM não ultrapassam a barreira placentária, sua detecção no RN possibilita o diagnóstico de infec-

ção congênita. Entretanto, sua sensibilidade é inferior ao isolamento viral, pois são detectados em apenas 50 a 70% dos recém-nascidos infectados.<sup>2</sup> A competição dos anticorpos IgM do RN com os anticorpos IgG maternos pelos antígenos presentes na lâmina de imunofluorescência ou na placa do ELISA pode contribuir para os resultados falso-negativos. A separação das frações IgG e IgM do soro antes do teste pode diminuir consideravelmente esse problema, existindo várias maneiras de se fazer essa separação no laboratório.<sup>19</sup> A utilização do teste ELISA de captura de IgM também representa um meio efetivo de diminuir os casos falso-negativos. Nesse teste, o orifício da placa é recoberto com anticorpos anti-IgM humanos, que vão “capturar” somente as moléculas de IgM presentes no soro a ser testado. Assim, todos os anticorpos IgG e eventuais complexos IgG-fator reumatoide serão eliminados com a lavagem inicial da reação. A seguir, adicionam-se antígenos do CMV, que se ligarão somente se houver moléculas de IgM anti-CMV “capturadas”, e depois um conjugado anti-CMV secundário e substrato. Por outro lado, pode haver resultados de IgM falso-positivos, devido à eventual presença no sangue no recém-nascido de fator reumatoide, que é uma imunoglobulina de classe IgM com atividade inespecífica contra IgG humana.<sup>45</sup> Desse modo, os anticorpos passivos IgG anti-CMV presentes no soro do RN, ao se ligarem aos antígenos do CMV presentes nas lâminas de IFI ou nas placas de ELISA, serão “reconhecidos” pelo fator reumatoide, o qual, por sua vez, será “reconhecido” pelo conjugado anti-IgM humano utilizado em ambas as reações. Por esse motivo, é obrigatória a pesquisa e, se positiva, a remoção do fator reumatoide sempre que se tenha uma amostra de sangue positiva para IgM.

Existem outras alternativas para contornar o problema do fator reumatoide, como a separação da fração IgM por diferentes métodos, e a utilização do teste ELISA de captura de IgM.<sup>19</sup>

A exemplo da excreção viral, a positividade do IgM anti-CMV pode persistir por muitos meses.

### Infecção congênita intrauterina

Frente a uma suspeita consistente de infecção aguda pelo CMV na gestante ou quando se detecta alguma anormalidade no ultrassom fetal compatível com esse diagnóstico (retardo do crescimento, ventriculomegalia cerebral, ascite, calcificações intracranianas, ou volume diminuído de líquido amniótico), existe indicação de investigar a possibilidade de infecção intrauterina pelo CMV. Como a absoluta maioria das infecções maternas pelo CMV é subclínica, a hipótese de infecção aguda pelo CMV durante a gestação ocorre, em geral, em consequência da detecção na gestante de IgM para o CMV durante exames pré-natais de rotina. O problema que surge a partir desse resultado está relacionado com o baixo valor preditivo da detecção de IgM para o CMV na gestação para infecção congênita. Na fase inicial da infecção primária, as concentrações de IgM podem ser muito baixas, confundindo a sua interpretação clínica. A resultante é que somente 10% das gestantes com IgM positivo darão à luz uma criança com infecção congênita pelo CMV.<sup>46,47</sup> Por isso, nesses casos, está indicada a pesquisa da avididade de anticorpos IgG. Esse teste baseia-se na dinâmica da maturação dos anticorpos IgG, que cursa com baixa avididade (< 30%) nas primeiras 8 a 12 semanas da infecção primária. Assim, percentuais inferiores a 30% sugerem que a infecção primária aguda tenha ocorrido há menos de 2 meses. Por outro lado, na reinfecção ou na reativação da infecção, a resposta de anticorpos IgG é rápida e feita basicamente à custa de anticorpos de alta avididade. Assim, o teste de avididade de IgG



tem sido amplamente utilizado para sugerir a diferenciação de infecções agudas primárias das infecções secundárias. O teste de avidéz de IgG tem valor preditivo negativo próximo a 100% em casos de gestantes com IgM positivo nas primeiras semanas da gestação. Contudo, embora o teste de avidéz de anticorpos IgG possa afastar, com boa margem de segurança, uma falsa infecção primária, quando aponta para uma infecção primária verdadeira, seu valor preditivo para infecção congênita confirmada é de apenas 25%, já que nem sempre ocorre infecção fetal durante a infecção primária materna.<sup>48</sup>

O passo seguinte consiste em demonstrar a presença do CMV no líquido amniótico. A pesquisa – por PCR ou por isolamento viral em culturas celulares – está indicada a partir da 21ª semana de gestação. Em gestantes com infecção primária confirmada, a demonstração do CMV no líquido amniótico tem valores preditivos negativos próximos de 100% tanto com o isolamento viral quanto com a PCR. Contudo, diferentes estudos mostram valores preditivos positivos (VPP) próximos de 100% com o isolamento viral, mas as taxas variam de 50 a 100% com a PCR, talvez pela maior sensibilidade desta técnica.<sup>47</sup>

Alguns autores recomendam a confirmação da detecção do CMV no líquido amniótico por pelo menos duas técnicas diferentes para maior segurança diagnóstica.<sup>49</sup>

## ▪ Infecção perinatal

A exemplo da infecção congênita, as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico de infecção perinatal são o isolamento viral ou a PCR em amostra de urina. No entanto, esse diagnóstico só pode ser feito se tivermos uma amostra de urina colhida nas primeiras 2 semanas de vida negativa para o CMV e outra positiva a partir da quarta semana de vida.<sup>7-9</sup> A negatividade de anticorpos IgM ao nascimento com posterior positividade também confirma esse diagnóstico.

Assim como na infecção congênita, a excreção viral na urina e orofaringe é prolongada, bem como a positividade do IgM.

## ▪ Infecção adquirida (citomegalomononucleose)

Para o diagnóstico de infecção adquirida pelo CMV, a técnica de eleição é a sorologia. No caso de empregar-se uma técnica para detecção de anticorpos IgG, deve-se demonstrar viragem sorológica (soro colhido na fase aguda negativo e, na convalescença, positivo) ou aumento de título de 4 vezes ou mais no soro de convalescença em relação ao soro colhido na fase aguda.

No caso de utilizar-se técnica que permita a detecção de IgM, geralmente uma única amostra colhida na fase aguda da doença já é suficiente para fazer o diagnóstico, desde que afastada a possibilidade de reação falso-positiva pela presença de fator reumatoide. Entretanto, é importante salientar que, algumas vezes, o IgM pode demorar 2 ou até 3 semanas para positivar-se, sendo, por isso, recomendável a repetição do exame negativo se ele foi colhido mais precocemente. Uma vez presentes, esses anticorpos permanecem na circulação por algumas semanas e desaparecem, geralmente, após 3 meses.

Nas infecções adquiridas, a detecção do CMV por meio da PCR ou do isolamento viral na urina e outras secreções, incluindo o sêmen, é frequente. No entanto, essas técnicas não são utilizadas rotineiramente nesses casos, não só pela facilidade diagnóstica oferecida pela sorologia, como também pela presença, na população geral, de excretadores assintomáticos do CMV.

## ▪ Pacientes imunocomprometidos

O diagnóstico de citomegalovirose no paciente imunocomprometido é complicado pelo fato de que a grande parcela deles – se não todos –, desde que sejam previamente soropositivos, irão apresentar, em alguma época de sua evolução, evidências de infecção ativa (replicação viral), sem que haja, na maioria das vezes, presença de doença clinicamente manifesta. A infecção ativa pode ser identificada por sorologia, ou pelo isolamento do vírus ou presença de antígenos ou DNA viral em diferentes locais do organismo.

Desse modo, para atribuir ao CMV determinada manifestação clínica, é fundamental demonstrar, direta ou indiretamente, a presença do vírus no local afetado, sendo a única exceção a retinite pelo CMV, por apresentar lesões características que podem ser visualizadas por meio de exame de fundo de olho. Há várias técnicas que podem ser usadas para detecção do CMV nos tecidos, como o exame histopatológico e o exame imuno-histoquímico empregando anticorpos monoclonais anti-CMV, sendo esta última mais adequada por apresentar maior sensibilidade. A PCR não é indicada com essa finalidade porque seu valor preditivo positivo é baixo, principalmente na vigência de viremia pelo CMV.

Além disso, é importante salientar que o comportamento do CMV é diferente conforme a doença imunodepressora em questão. Assim, enquanto a demonstração do CMV no pulmão ou lavado broncoalveolar de um paciente submetido a transplante de medula indica, com grande probabilidade, que existe ou existirá, em breve intervalo, pneumonite,<sup>50</sup> o mesmo não acontece em pacientes portadores de AIDS.<sup>51,52</sup>

Do mesmo modo, em alguns tipos de transplante de órgãos (p. ex., rim e fígado) é importante diferenciar a infecção primária da reativação ou da reinfecção pelo CMV, já que no primeiro caso a probabilidade de adoecimento é muito maior.<sup>15</sup> O mesmo não acontece em transplantes de medula, em que essa diferença, em relação ao CMV, não tem a mesma importância.

Dentre as particularidades desse grupo de pacientes, destaca-se também o fato de que, ao contrário do que ocorre no paciente imunocompetente, no imunodeprimido a existência de IgM não significa obrigatoriamente infecção primária, já que é relativamente frequente observarem-se pacientes previamente soropositivos que, ao apresentarem reativação ou reinfecção pelo CMV durante a doença imunodepressora, positivam o IgM.<sup>16,53</sup> Assim, a sua ocorrência não pode ser utilizada isoladamente para diferenciar a infecção primária da reativação ou da reinfecção.

Embora a demonstração direta ou indireta da presença do vírus no órgão acometido seja o melhor meio de comprovar laboratorialmente a participação do CMV naquele determinado quadro clínico, muitas vezes não se dispõe de biopsias para executar essa pesquisa. Uma alternativa para esses casos é a pesquisa do CMV no sangue, pois está demonstrado que existe uma boa correlação entre viremia positiva, carga viral elevada e doença invasiva pelo CMV. Essa correlação é a base do que atualmente denomina-se “vigilância viral pós-transplante”, na qual é feito o monitoramento sistemático da viremia pelo CMV no período pós-transplante, introduzindo-se, dependendo do resultado, tratamento anti-CMV antes do início dos sintomas (tratamento pré-sintomático ou *preemptive*). Hoje, existe um consenso de que a vigilância viral em receptores de transplantes deve ser feita empregando-se uma das técnicas quantitativas disponíveis, pois está bem estabelecido que o risco de adoecimento é maior quando a carga viral do



CMV no sangue é maior.<sup>54</sup> Dentre as técnicas rápidas quantitativas utilizadas atualmente, encontram-se a pesquisa direta do antígeno pp65 do CMV em neutrófilos circulantes (técnica da antigenemia) e a PCR em tempo real. Diversos estudos têm mostrado uma boa correlação entre a PCR em tempo real e a antigenemia pp65.<sup>29,33,35</sup> Contudo, valores de corte específicos para iniciar a terapêutica pré-sintomática devem ser determinados de acordo com o teste utilizado (PCR em tempo real ou antigenemia pp65) e tipo de transplante. Se possível, validado em cada centro por meio de estudos prospectivos, já que a maioria dos centros de transplante utiliza técnicas *in house* não comerciais. A escolha de um ou outro método vai depender das facilidades encontradas nos diferentes centros de transplante e da experiência da equipe com um ou outro método. Isso deve ser estabelecido prospectivamente, pois ainda não está totalmente definido, em relação a cada subgrupo de doenças imunodepressoras, qual dessas técnicas tem o melhor valor preditivo para adoecimento.

## ► Referências bibliográficas

- Carvalho RPS, Pannuti CS, Amato Neto V *et al.* Estudo soro-epidemiológico da infecção pelo citomegalovírus em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1976; 18:1-5.
- Pannuti CS. Infecção pelo citomegalovírus. Estudo em dois hospitais públicos no município de São Paulo. São Paulo, 1983. (Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.)
- Stinski MF. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, eds. *Fields Virology*, 2nd ed, New York: Raven Press, 1990, p. 1959-1980.
- Istas AS, Demmler GJ, Dobbins JG *et al.* *Clin Infect Dis* 1995; 20:665-670.
- Stagno S, Reynolds DW, Huang ES *et al.* Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in an immune population. *N Engl J Med* 1977; 296:1254-1258.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF *et al.* The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326:663-667.
- Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS *et al.* Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med*, 1973; 289:1-5.
- Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford Jr CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1980; 302:1073-1076.
- Machado CMM, Fink MCDS, Vilas Boas LS *et al.* Infecção perinatal pelo citomegalovírus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:159-166.
- Vilas Boas LS, Pannuti CS, Sumita LS *et al.* Isolamento de citomegalovirus em 83 amostras de leite materno. *Anais do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 15-20 de fevereiro de 1987, Curitiba.
- Sandsfield HH, Chandler SH, Caine VA *et al.* Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission. *J Infect Dis* 1985; 151:344-348.
- Klemola E, Von Essen R, Wager O *et al.* Cytomegalovirus mononucleosis in previously healthy individuals. *Ann Intern Med* 1969; 71:11-19.
- Pannuti CS, Vilas Boas LS, Angelo MJO *et al.* Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: Differences in clinical presentation. *Scand J Infect Dis* 1985; 17:153-156.
- Ho M. Cytomegalovirus infections and diseases. *Dis Mth (Chic)* 1978; 24:4-58.
- Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Rev Infect Dis* 1990; 12(suppl 7):S754-S766.
- Turchi MD, Pannuti CS, Sumkita LM *et al.* Infecção pelo citomegalovírus em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS): Relações clínico-virológicas e anátomo-patológicas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:243-250.
- Schooley RT. Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis*, 1990; 12(suppl 7):S811-S819.
- Macris MP, Nahmias AJ, Bailey PD *et al.* Electron microscopy in the routine screening of newborns with congenital cytomegalovirus infection. *J Virol Methods* 1981; 2:315-320.
- Hodinka RL, Friedman HM. Human cytomegalovirus. In: Ballows A, Hausler Jr. WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed, Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1991, p. 829-837.
- Goldstein LC, McDougall J, Hackman R *et al.* Monoclonal antibodies to cytomegalovirus: rapid identification of clinical isolates and preliminary use in diagnosis of cytomegalovirus pneumonia. *Infect Immun* 1982; 38:273-281.
- Martin WJ, Smith TF. Rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens by a monoclonal antibody method. *J Clin Microbiol* 1986; 23:1006-1008.
- Van der Bij W, Torensma R, Van Son WJ *et al.* Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J Med Virol* 1988; 25:179-188.
- Volpi A, Whitley RJ, Ceballos R *et al.* Rapid diagnosis of pneumonia due to cytomegalovirus with specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1983; 147:1119-1120.
- Meyers JD, Ljungman P, Fisher LD. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J Infect Dis* 1990; 162: 373-380.
- The TH, Van der Ploeg M, Van den Berg AP *et al.* Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes – A review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 1992; 54: 193-198.
- Gerna G, Zipeto D, Parea M *et al.* Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 164: 488-498.
- Demmler GJ *et al.* Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988; 158:1177-1184.
- Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V *et al.* Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006; 117:e76-83.
- Cariani E, Pollara CP, Valloncini B *et al.* Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for human cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infect Dis* 2007; 7:138.
- Cathomas G, Morris P, Pekle K *et al.* Rapid diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and the direct immunostaining of alveolar cells. *Blood* 1993; 81:1909-1914.
- Gerna G, Zipeto D, Parea M *et al.* Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 164:488.
- The TH, Van der Ploeg M, Van den Berg AP *et al.* Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes – A review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 1992; 54:193-198.
- Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Risca C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas-Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol* 2004; 30:258-66.
- Gouarin S, Vabret A, Scieux C *et al.* Multicentric evaluation of a new commercial cytomegalovirus real-time PCR quantitation assay. *J Virol Methods* 2007; 146:147-154.
- Allice T, Cerutti F, Pittaluga F *et al.* Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *J Virol Methods* 2008; 148:9-16.
- Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21:217-221.
- Pillay D, Charman H, Lok J, Griffiths PD. Detection of cytomegalovirus by a rapid culture system: a comparison of monoclonal antibodies in a clinical setting. *J Virol Methods* 1992; 40:219-224.
- Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull Wld Hlth Org* 1973; 49:103-106.
- Beckwith DG, Halstead DC, Alpaugh K *et al.* Comparison of a latex agglutination test with five other methods for determining the presence of antibody against cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1985; 21:328-331.
- McHugh TM, Casavant CH, Wilber JC, Stites DP. Comparison of six methods for the detection of antibody to cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1985; 22:1014-1019.
- Langenhuyzen MMAC. IgM levels, specific IgM antibodies and liver involvement in cytomegalovirus infection. *Scand J Infect Dis* 1972; 4:113-118.
- Pannuti CS, Stewien KE, Carvalho RPS *et al.* Síndrome “mononucleose simle” na infância. Incidência da infecção por citomegalovírus diagnosticada através de detecção imunoenzimática de anticorpos IgM. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1983; 25:300-304.
- Phipps PH, Gregoire L, Rossier E, Perry E. Comparison of five methods of cytomegalovirus antibody screening of blood donors. *J Clin Microbiol* 1983; 18:1296-1300.



44. Stagno S, Pass RF, Reynolds DW *et al.* Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1980; 65:251-257.
45. Shirodaria PV, Fraser KB, Stanford F. Secondary fluorescent staining of virus antigens by rheumatoid factor and fluorescein-conjugated anti-IgM. *Ann Rheum Dis* 1973; 32:53-57.
46. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P *et al.* Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis* 1997; 175:944-6.
47. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P *et al.* Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3540-4.
48. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Varani S *et al.* Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:127-9.
49. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2004; 29: 71-83.
50. Schmidt GM, Horak DA, Niland JC *et al.* A randomized trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *N Engl J Med* 1991; 324:1005-1011.
51. Millar AB, Patou G, Miller RF *et al.* Cytomegalovirus in the lungs of patients with AIDS. Respiratory pathogen or passenger? *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:1474-1477.
52. Miles PR, Baughman RP, Linnemann Jr CC. Cytomegalovirus in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with AIDS. *Chest* 1990; 97:1072-1076.
53. Pannuti CS, Vilas Boas LS, Amato Neto V *et al.* Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 29:317-322.
54. Kotton CM, Kumar D, Caliendo AM *et al.* International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; 89:779-795.



## Capítulo 5

---

# Dengue

*Antonio Walter Ferreira*

- Diagnóstico laboratorial, 70
- Bibliografia, 72



A dengue (DEN) é uma doença infecciosa provocada por um vírus da família Flaviviridae, genoma de RNA, que apresenta quatro sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) e está relacionada não apenas com as condições sociais da população, mas também com os descuidos e desmandos no armazenamento ou descarte de produtos que podem acumular água. Pequenos volumes de água são suficientes para a multiplicação de larvas de mosquitos, *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, principais responsáveis por sua transmissão. A transmissão da doença pelo controle dos vetores é meta que está muito longe de ser atingida. Nenhuma iniciativa foi capaz, ainda, de estabelecer o controle da doença visando à sua erradicação. Os objetivos não foram alcançados com a utilização de procedimentos simples, como a conscientização da população sobre águas paradas, nem por meio de pesquisas complexas, como o uso da engenharia genética na modificação dos vetores.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo ocorram aproximadamente 100 milhões de casos anualmente, com cerca de 20.000 mortes, e que mais de dois bilhões de pessoas transitem em áreas de risco de contrair a doença. Esses dados estão subestimados por falta de informações concretas sobre a ocorrência da doença em muitas regiões da África e do Sudeste Asiático. Dados concretos para as Américas foram apresentados por Guzman, em 2011, ao comentar os casos notificados pela PAHO/OMS para o período de 1980 a 2010. Em 1981, Cuba foi o país responsável pelo maior número de casos clínicos da doença, com 344.203 dos quase 400.000 casos que foram notificados na região. Durante o período de 1982 a 1997, o número total de casos oscilou entre 300.000 e 400.000, sem destaque individual para nenhum país. Essa oscilação, considerada normal, mostrava que a transmissão vetorial estava parcialmente controlada com a conscientização da população para os riscos da expansão da doença. Porém, a partir de 1998 tivemos uma drástica mudança nesse quadro, com quase 800.000 casos da doença, principalmente no Brasil, com 535.338 casos, seguido da Colômbia, Venezuela e México, com cerca de 50.000 casos cada um. Esses dados provocaram um alarme geral e diferentes medidas sanitárias foram adotadas nos países envolvidos, o que representou uma queda significativa do número total de casos para patamares considerados dentro da normalidade. Com a falta de cobrança efetiva das medidas implantadas, a doença recrudescceu em 2002, quando o Brasil novamente liderou a lista de países acometidos, com 780.644 dos mais de 1.000.000 dos casos notificados, seguido da Colômbia, Venezuela e Honduras. Após mais um período de normalidade entre 2002 e 2007, vimos aumento significativo no número de casos, com destaque para o ano de 2009, com 1.700.000 (Brasil, 528.883; México, 165.748; Bolívia, 82.159; Colômbia, 71.079; Venezuela, 65.869; e Argentina, 26.612), e 2010, com quase 2.000.000 de casos, dos quais 1.004.392 ocorreram no Brasil. A maior incidência de casos no Brasil é notificada no estado do Rio de Janeiro. Diante desses números, não há como negar o descaso dos governos com os programas de controle da dengue. A vigilância sanitária precisa estar sempre atenta aos criadouros dos mosquitos para eliminá-los, mesmo que seja desgastante para os governos implementar as ações que devem ser realizadas.

A apresentação grave da doença, a dengue hemorrágica (DH), ocorre em mais de 100 países, aumentando o risco de óbitos na população atingida. No Quadro 5.1 apresentamos dados da PAHO/OMS sobre a ocorrência de óbitos por dengue hemorrágica nas Américas no período de 2001 a 2010.

**Quadro 5.1 - Regiões afetadas pela dengue, no período de 2001 a 2010, número total de casos, porcentagem de dengue hemorrágica e de óbitos.**

Região	Total de casos	DH	Óbitos
América do Norte	553	0	0
América Central e México	952.903	36.603 (3,8%)	441 (1,2%)
Região Andina	1.411.524	74.909 (5,3%)	599 (0,8%)
Cone Sul	4.930.788	30.703 (0,6%)	1.265 (4,1%)
Caribe	318.771	5.160 (1,6%)	493 (9,5%)
Total	7.614.539	158.788 (2,1%)	2.798 (1,8%)

DH = dengue hemorrágica.

Está demonstrado que o aumento da gravidade nos casos de dengue está relacionado com o constante aumento da circulação dos quatro sorotipos do vírus em áreas urbanas densamente povoadas, que podem provocar dengue, dengue hemorrágica e síndrome do choque (DC). Uma observação epidemiológica relacionada com o sorotipo responsável pela infecção primária mostrou que sorotipos dos grupos 1 e 3 frequentemente se relacionam com complicações mais graves do que infecções primárias provocadas por sorotipos dos grupos 2 e 4.

A patogenia da doença e sua evolução para formas graves ainda está longe de ser esclarecida, embora existam numerosos estudos a respeito. Em geral, as infecções são assintomáticas ou subclínicas e provocam leves sintomas. Quando a doença se instala temos um quadro clínico constituído por febre alta, intensa dor de cabeça, dores musculares, dores articulares e *rash* cutâneo. Em alguns casos, os pacientes podem apresentar petéquias e trombocitopenia. Uma porcentagem não definida, mas estimada, de pacientes pode evoluir para formas graves da doença, dengue hemorrágica e síndrome do choque, na qual ocorre o comprometimento do sistema hematológico com falha na circulação sanguínea.

Também ainda não dispomos comercialmente de vacinas eficazes e medicamentos específicos que possam ser utilizados quando existe suspeita clínica da doença. No ano de 2012 foram avaliados, pelo menos, 12 produtos candidatos a base de vacina. Expectativas otimistas estão relacionadas com os produtos desenvolvidos por Sanofi-Pasteur em colaboração com uma universidade na Tailândia e GlaxoSmithKline, em colaboração com Walter Reed Army Institute, que se encontra em fase mais adiantada do estudo. No Brasil, o Instituto Butantã está desenvolvendo uma vacina contra os quatro sorotipos do vírus da dengue que se encontra na fase de pesquisa e desenvolvimento, sem previsão para entrar em comercialização.

Normalmente o diagnóstico da dengue se baseia em achados clínicos, epidemiológicos ou laboratoriais, incluindo exame hematológico, dosagem de albumina, prova de função hepática e exame de urina para pesquisar a presença de hematuria, sendo a febre, durante o surto epidêmico, a informação clínica mais relevante a ser considerada. A prova do laço, para verificar a formação de petéquias, é amplamente utilizada durante os surtos epidêmicos, embora não seja específica.

## ► Diagnóstico laboratorial

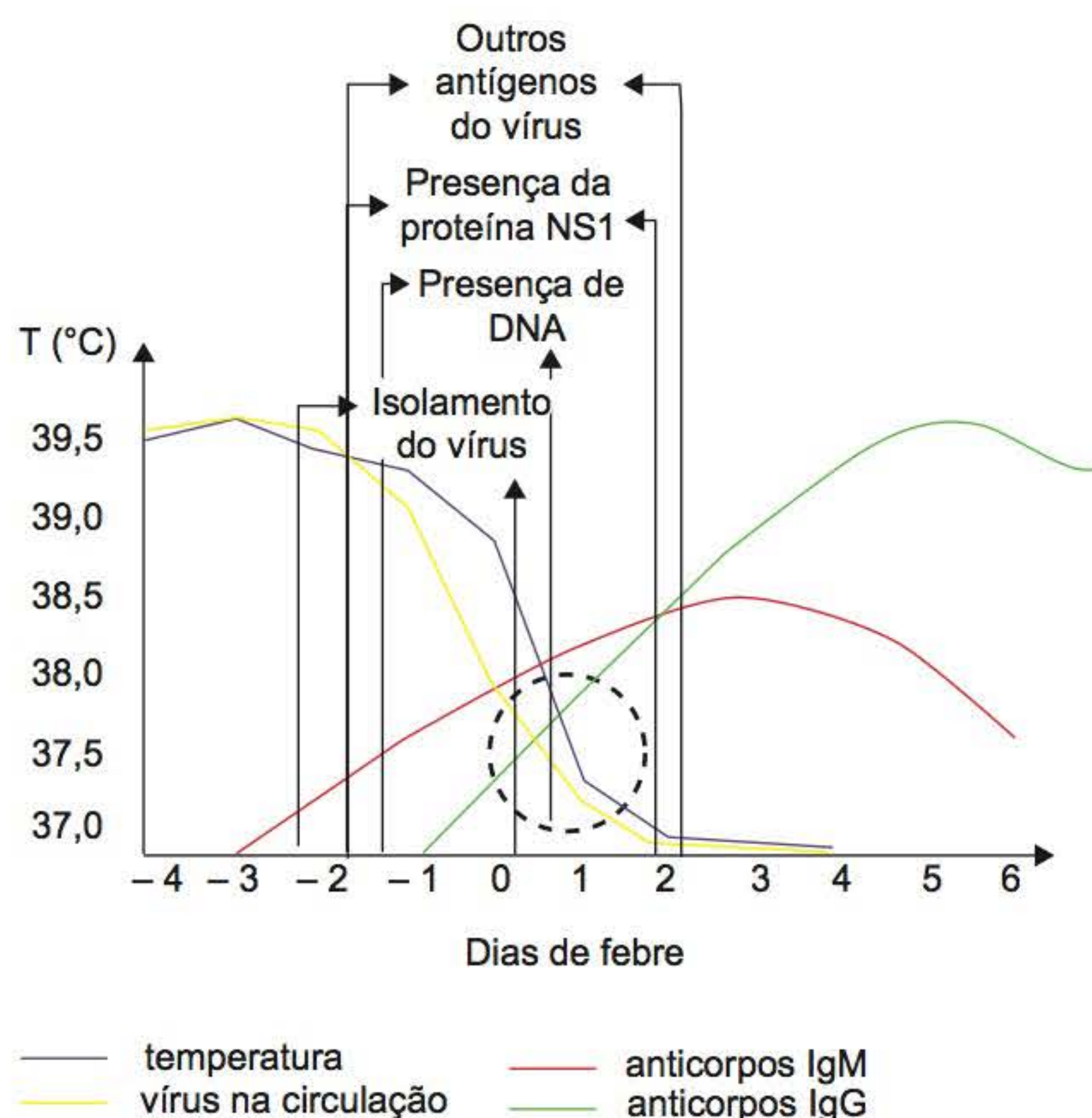
O diagnóstico laboratorial da dengue é complexo e exige metodologia capaz de diferenciar as fases clínicas da doença, principalmente a infecção primária, de curta duração e difícil de ser diagnosticada clinicamente.



Assim, os métodos de laboratório devem ser padronizados para realizar o diagnóstico da infecção primária durante a fase de viremia (microbiológico – isolamento do vírus; biologia molecular – reação em cadeia da polimerase [PCR] e PCR em tempo real [RT-PCR]; e imunológicos – pesquisa de componentes antigênicos do vírus) e confirmar a infecção viral e, durante a fase secundária, para pesquisar anticorpos IgM e IgG contra sorotipos do vírus. O aumento do título de anticorpos IgG entre duas coletas de sangue, avaliado por teste imunoenzimático – ELISA, inibição da hemaglutinação ou neutralização, confirma infecção anterior pelo vírus. Como espécimes clínicos podem ser utilizados sangue total, ideal para inquéritos soropidemiológicos e para testes rápidos, soro, plasma e fragmentos de órgãos colhidos *post mortem* para isolamento e identificação do vírus e seu sorotipo.

A Figura 5.1 mostra a evolução da infecção primária desde o período febril até a presença de anticorpos IgG em altos títulos que permanecem positivos por muitos anos como memória da infecção viral. Nessa fase, métodos de biologia molecular têm sido padronizados para a pesquisa do DNA viral e comparados com métodos imunológicos para a pesquisa da proteína não estrutural NS1 e/ou para outros componentes antigênicos do vírus. Embora demande custos mais elevados, o método de PCR em tempo real tem apresentado resultados promissores, mas ainda não instaura nenhuma perspectiva de termos no mercado um produto para ser comercializado. A presença de anticorpos IgM em uma única amostra de soro do paciente confirma a infecção na fase inicial da doença, mas sua detecção ocorre apenas após o início da doença.

Em 2010, Peeling *et al.* publicaram uma excelente avaliação dos diferentes testes utilizados para o diagnóstico da dengue. Inicialmente, apresentaram os requisitos para um teste ideal levando em consideração as necessidades para o diagnóstico precoce, surtos epidêmicos, inquéritos soropidemiológicos e avaliação da eficácia vacinal. Os requisitos apresentados pelos autores não diferem dos requisitos necessários para o diagnóstico de qualquer processo infeccioso, seja de origem viral, bacteriana, fúngica ou parasitológica. No caso específico da dengue, os testes devem ser padronizados para o diagnóstico durante o período febril da doença, como já dito anteriormente. Um



**Figura 5.1** Marcadores imunológicos, moleculares e microbiológicos da infecção por dengue durante o período febril. Adaptada de Vaughn *et al.*, 1997.

aspecto interessante que deve ser lembrado durante o período febril, em áreas endêmicas da doença, é a possibilidade de isolar o vírus para identificar o sorotipo que está circulando.

Nessa fase, os testes deverão ser muito sensíveis e capazes de diferenciar as infecções por vírus da dengue de outros processos infecciosos com quadro clínico semelhante. Além disso, os testes deverão ser de fácil execução, para serem realizados em diferentes locais de áreas rurais ou urbanas, onde muitas vezes a infraestrutura física é precária e os recursos humanos são limitados.

O isolamento do vírus para a caracterização dos sorotipos requer condições especiais de infraestrutura física e humana. Para a cultura do vírus da dengue normalmente são utilizadas células de mosquitos ou células de linhagem contínua, VERO ou LLCMK2, com sangue total, soro ou plasma como material biológico. Normalmente, os sorotipos são assim identificados: por meio de anticorpos monoclonais específicos para os diferentes sorotipos marcados com isotiocianato de fluoresceína para a imunofluorescência direta e por meio de anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongos marcados com isotiocianato de fluoresceína para a imunofluorescência indireta. A caracterização dos sorotipos por biologia molecular tem apresentado bons resultados quando a RT-PCR é utilizada, pois essa técnica permite, além da quantificação da carga viral, o processamento de grande número de amostras simultaneamente. Resultados falso-positivos, a falta de padronização e industrialização de um reagente definitivo e a ausência de registro do produto nos órgãos competentes de saúde de cada país limitam o uso dessa técnica para produtos feitos *in house* em laboratórios especializados em virologia.

Os métodos imunológicos para a detecção de componentes antigênicos do vírus são padronizados para serem utilizados na fase precoce da infecção. Um antígeno-alvo interessante que está sendo exaustivamente estudado é a proteína não estrutural NS1, que se apresenta em altas concentrações no soro de pacientes durante a fase primária da infecção. O tempo de aparecimento desse antígeno é variável, sendo em média de 9 dias após o início da doença. Anticorpos monoclonais contra o antígeno NS1 foram produzidos e estão sendo usados em testes rápidos imunocromatográficos e em testes imunoenzimáticos. A proteína NS1 está presente nos quatro sorotipos do vírus e sua detecção não permite a diferenciação do tipo de vírus que está circulando e causando a doença. A possibilidade de falsos resultados negativos pode ocorrer quando a proteína NS1 está complexada com anticorpos. Esse fato pode ocorrer, principalmente, no início da fase secundária da doença e pode ser evitado pelo tratamento dos soros com substâncias químicas que dissociam o complexo.

O diagnóstico sorológico da dengue fundamenta-se na pesquisa de anticorpos IgM e IgG contra componentes antigênicos do vírus. Durante a fase primária da infecção, anticorpos IgM são detectados após o início dos sintomas e permanecem elevados até o quinto dia da doença, quando começam a declinar. Na fase secundária da doença os anticorpos IgM são detectados em baixos títulos sem apresentarem valor clínico a não ser que se elevem significativamente, o que pode estar relacionado com uma nova infecção provocada por outro sorotipo do vírus.

Anticorpos IgG antivírus da dengue estão presentes em altos títulos na fase secundária da doença, o que confere ao paciente uma certa proteção se tiver novo contato com vírus do mesmo sorotipo. Reações inespecíficas, com falsos resultados positivos, estão presentes entre os quatro sorotipos e outras flavivíruses. A importância clínica da pesquisa de anticorpos IgG está relacionada com inquéritos soropidemiológicos, com o diagnóstico da infecção (quando se observa o aumento significativo de títulos entre duas coletas de sangue do mesmo paciente) e com a avaliação da eficácia vacinal.

Os testes que estão disponíveis comercialmente no Brasil são os ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA e os testes rápidos



**Quadro 5.2 - Produtos disponíveis no Brasil, tempo necessário para a realização, princípio da técnica e fabricante.**

Produto	Tempo (min)	Princípio	Fabricante
Kit Platelia Dengue NS1 Ag	120	Deteção qualitativa ou semiquantitativa do antígeno NS1 por ELISA	Bio-Rad Laboratories Inc. – França
Kit Dengue NS1 Ag Strip (Teste Rápido)	15	Deteção qualitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue no soro ou plasma humano por imunocromatografia de fluxo lateral	Bio-Rad Laboratories Inc. – França
Simplexatm Dengue kit	60	PCR em tempo real para reação multiplex desenvolvido e destinado à deteção qualitativa e diferenciação <i>in vitro</i> dos sorotipos dos vírus DENV 1, 2, 3 e 4	Focus Diagnostisc Inc. – EUA
Dengue IgG IgM Teste rápido	15	Imunocromatografia para deteção da infecção pelo vírus da dengue diferenciando as infecções primária e secundária	PanBio
Dengue IgG Indireto	130	Método ELISA para deteção dos sorotipos DENV 1, 2, 3 e 4. Faz a distinção entre as infecções primária e secundária	PanBio
Dengue IgM Captura	130	Método ELISA para deteção de anticorpos IgM. Detecta os sorotipos DENV 1, 2, 3 e 4	PanBio
Dengue NS1	130	Método ELISA para deteção qualitativa do antígeno NS1 da dengue. Auxilia no diagnóstico precoce das infecções primária e secundária	PanBio
Dengue NS1 – Teste Rápido	15	Ensaio imunocromatográfico para deteção qualitativa de antígeno NS1	PanBio
Dengue Duo Dengue NS1 + Ac Combo	20	Método de imunocromatografia de passo único para deteção qualitativa e diferencial do antígeno NS1 e anticorpos IgG e IgM	SD Bioline
Dengue NS1 Ag	20	Método de imunocromatografia de passo único para deteção qualitativa do antígeno NS1	SD Bioline
Dengue IgG/IgM Sangue Total	20	Método de imunocromatografia em fase sólida para diagnóstico <i>in vitro</i> , para deteção qualitativa e diferencial de anticorpos IgG e IgM contra o vírus da dengue, sorotipos DEN-1, 2, 3 e 4	SD Bioline
SD Dengue NS1 Ag ELISA	130	Método imunoenzimático para deteção qualitativa do antígeno NS1	SD Bioline
Dengue IgG/IgM ABON	10	Método de imunocromatografia para deteção de anticorpos IgM e IgG nas infecções primária e secundária	Abon
Dengue Duo Test Bioeasy	20	Método de imunocromatografia para deteção do antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG nas infecções primária e secundária	Bioeasy Diagnóstica Ltda.
Pathozyme Dengue IgM Captura (ELISA)	130	Método imunoenzimático para deteção de anticorpos IgM	Omega Diagnostics Ltd.
Visitect Dengue	20	Método de imunocromatografia qualitativo rápido para a deteção simultânea de anticorpos IgM e IgG para todos os quatro sorotipos do vírus da dengue	Omega Diagnostics Ltd.
Dengue IgG/IgM Teste Biocon	15	Teste rápido qualitativo para deteção diferencial de anticorpos IgG e IgM contra os 4 sorotipos do vírus da dengue (DEN1, DEN2, DEN3, DEN4)	Biocon

imunocromatográficos, devidamente registrados na Anvisa para serem utilizados no diagnóstico de casos suspeitos e monitoramento de pacientes. A soroconversão ou o aumento de títulos entre duas coletas confirmam a infecção. Um fator que dificulta esse aspecto do diagnóstico é a coleta de duas amostras de sangue do mesmo paciente. Por diversos motivos, geralmente o paciente não retorna aos serviços para a segunda coleta de sangue, principalmente se as áreas em estudo forem de poucos recursos sociais.

Um formato interessante de teste baseia-se na deteção simultânea de antígeno (NS1) e anticorpos IgM e IgG. Várias empresas de biotecnologia têm explorado esse modelo visando ao diagnóstico precoce da doença. Os reagentes disponíveis apresentam bons índices de sensibilidade, especificidade e, principalmente, reprodutibilidade entre sucessivos lotes.

Os testes imunocromatográficos rápidos têm sido padronizados para serem utilizados com diferentes amostras biológicas, como sangue total, soro e plasma. Não existem estudos do uso de amostras de sangue colhidas em papel de filtro com reagentes comerciais.

Como limitações dos testes rápidos, destacamos: o custo por teste é maior do que o dos testes convencionais; os resultados são qualitativos; a leitura é subjetiva, levando a um grande número de resultados inconclusivos; não são recomendáveis para grandes rotinas; há persistência de reação positiva em amostras de sangue de um número não determinado até o momento, além do período estimado na literatura médica.

Estudos comparativos de testes rápidos com RT-PCR ou cultura do vírus mostraram sensibilidade de 93% e especificidade de 98%. Comparado com o teste de hemaglutinação indireta, apresentou sensibilidade de 99,5% e especificidade de

95%. Em relação ao teste imunoenzimático, ELISA, para a pesquisa de IgG, IgM e NS1, a concordância de resultados ficou próxima a 99% de sensibilidade e 98,5% de especificidade.

No Quadro 5.2 apresentamos produtos disponíveis no mercado brasileiro e devidamente registrados na Anvisa. Os produtos da Bio-Rad são distribuídos por Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, com preço médio por teste de U\$ 3 para o *kit* Platelia e U\$ 6 para o reagente imunocromatográfico. Os produtos da FOCUS Diagnostics e da PANBIO são distribuídos por Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda. com preços variáveis entre U\$ 3 e U\$ 7 por teste.

## ► Bibliografia

- Adams P. Dengue: neglected no more. TropIKA Blog Portal Tropical Diseases Research to Foster Innovation & Knowledge Application, 2011. Disponível no site oficial da Anvisa: <http://-anvisa.gov.br>.
- Guzman MG *et al.* Dengue in American region. An update. Disponível no site TropIKA.net – Tropical Diseases Research to Foster Innovation & Knowledge Application: <http://www.tropika.net>.
- Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R *et al.* Multicountry evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. PLoS Negl Trop Dis Aug 31 2010; 4(8).
- I International Symposium on Dengue FMUSP: Changes in Epidemiology and Challenges in Diagnosis and Prevention. Rev Inst Med Trop S Paulo August 2012; 4(suppl. 18).
- Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nat Rev Microbiol Dec 8 2010; (12 Suppl):S30-8.
- Vaughn *et al.* Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. J Infect Dis 1997; 176:322-30.
- WHO/TDR. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: WHO Press, 2009.



## Capítulo 6

---

# Hepatites Virais

*Angela Maria Egydio de Carvalho Barreto,  
João Renato Rebello Pinho e  
Ester Cerdeira Sabino*

- Hepatite A, 74
- Hepatite B, 76
- Hepatite C, 82
- Hepatite delta, 87
- Vírus da hepatite E, 89
- Hepatites não A, não B, não C, não D, não E (não A-E), 91
- Sumário do diagnóstico laboratorial das hepatites virais, 92
- Referências bibliográficas, 94



As hepatites virais constituem uma das principais preocupações de saúde no mundo, com maior incidência nos países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos. Embora seja uma doença antiga, foi classificada apenas no século 20 como “hepatite infecciosa” ou “hepatite sérica”,<sup>1</sup> com base em vários estudos epidemiológicos. Essas duas formas de hepatite foram distinguidas de acordo com o seu modo de transmissão, ou seja, oro-fecal a tipo A e parenteral a tipo B, respectivamente.

Em 1963, Blumberg, analisando o sangue de um aborígene australiano, encontrou uma partícula que foi denominada de antígeno Austrália (AU), e posteriormente ela foi relacionada com a hepatite B.<sup>1</sup> A etiologia viral da hepatite B foi estabelecida por meio de estudos com microscopia eletrônica por Dane em 1970, e essa partícula passou a se chamar partícula de Dane,<sup>2</sup> que corresponde à partícula viral completa do vírus da hepatite B (HBV). Entre as hepatites virais humanas, a causada pelo HBV foi a primeira a ter o genoma de seu agente causal identificado e caracterizado.

Essas descobertas possibilitaram o desenvolvimento de testes sorológicos para a pesquisa do vírus, e, com isso, na década 1970 foi introduzido na triagem sorológica de doadores de sangue um teste para detectar o antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Com essa medida, houve diminuição das hepatites pós-transfusionais (HPT), que antes ocorriam em até 20% dos casos.<sup>1</sup> Com o aumento da sensibilidade dos testes de radioimunoensaio (RIA) e imunoenzimáticos (ELISA) para detecção do AgHBs, os casos de hepatite B foram drasticamente reduzidos, embora ainda continuassem a ocorrer em pequena proporção. Durante duas décadas, todas as hepatites que não puderam ser identificadas pela utilização dos marcadores sorológicos das hepatites A e B passaram a ser rotuladas de hepatites pós-transfusionais não A não B. Em 1989, Choo *et al.*<sup>3</sup> descobriram o vírus da hepatite C (HCV) que pode ser associado à maioria dos casos pós-transfusionais de hepatite não A não B, os quais passaram a ser muito raros. Outros agentes, tais como o vírus da hepatite G (HGV) e o vírus TT, foram descobertos, porém nenhum que pudesse ser associado de modo definitivo à hepatite.

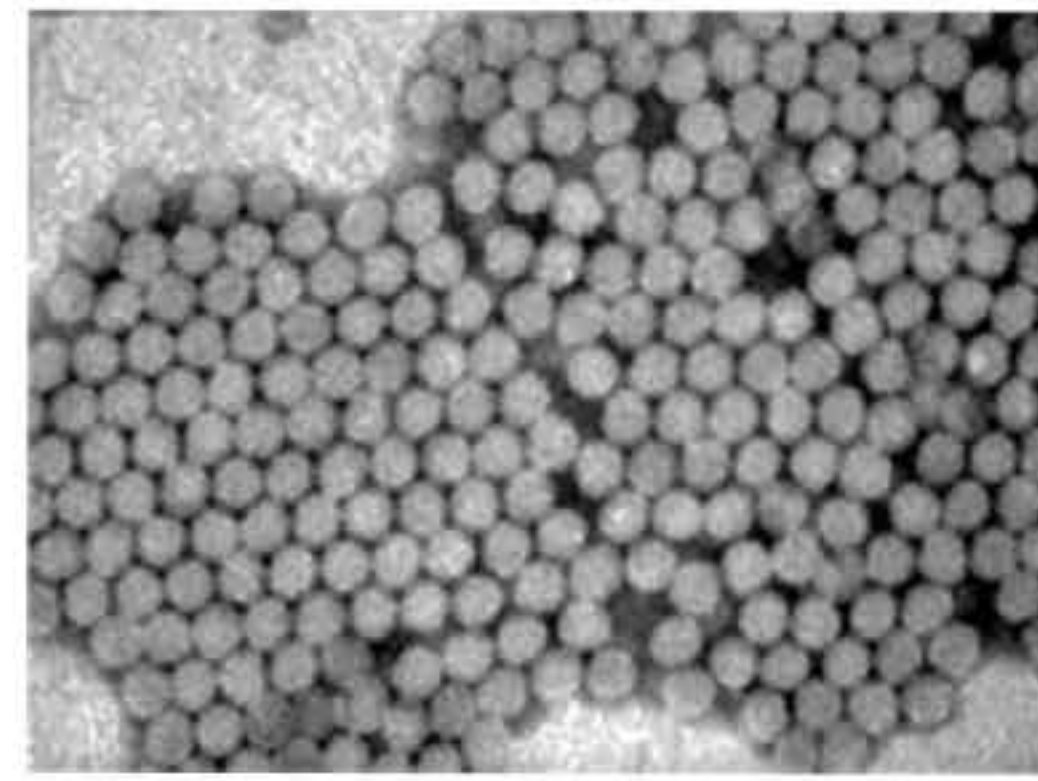
## ► Hepatite A

### ■ Características e constituição genômica do vírus da hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) foi identificado, pelo método de imunoeletromicroscopia (Figura 6.1),<sup>4</sup> em 1973 por Feinstone *et al.* nas fezes de indivíduos infectados experimentalmente, e sua propagação em cultura de células foi feita, com sucesso, em 1979.<sup>5</sup>

O agente etiológico da hepatite A foi inicialmente classificado como enterovírus, e em 1991 foi subclassificado em seu próprio e único gênero: *Hepatovirus*. Pertence à família Picornaviridae,<sup>6</sup> e até o momento foi identificado somente um sorotipo do HAV humano. As cepas isoladas do HAV possibilitaram classificá-lo em sete genótipos que diferem de 15 a 25% em sua homologia. Entre eles, quatro genótipos infectam o ser humano (I, II, III e VII), sendo os mais prevalentes o I e o III,<sup>7</sup> e três infectam naturalmente primatas não humanos (IV, V e VI). A caracterização dos genótipos pode ser utilizada para rastrear a transmissão da infecção.

A partícula viral é pequena, esférica, com simetria icosaédrica, de diâmetro entre 27 e 32 nm, não envelopada, e consiste



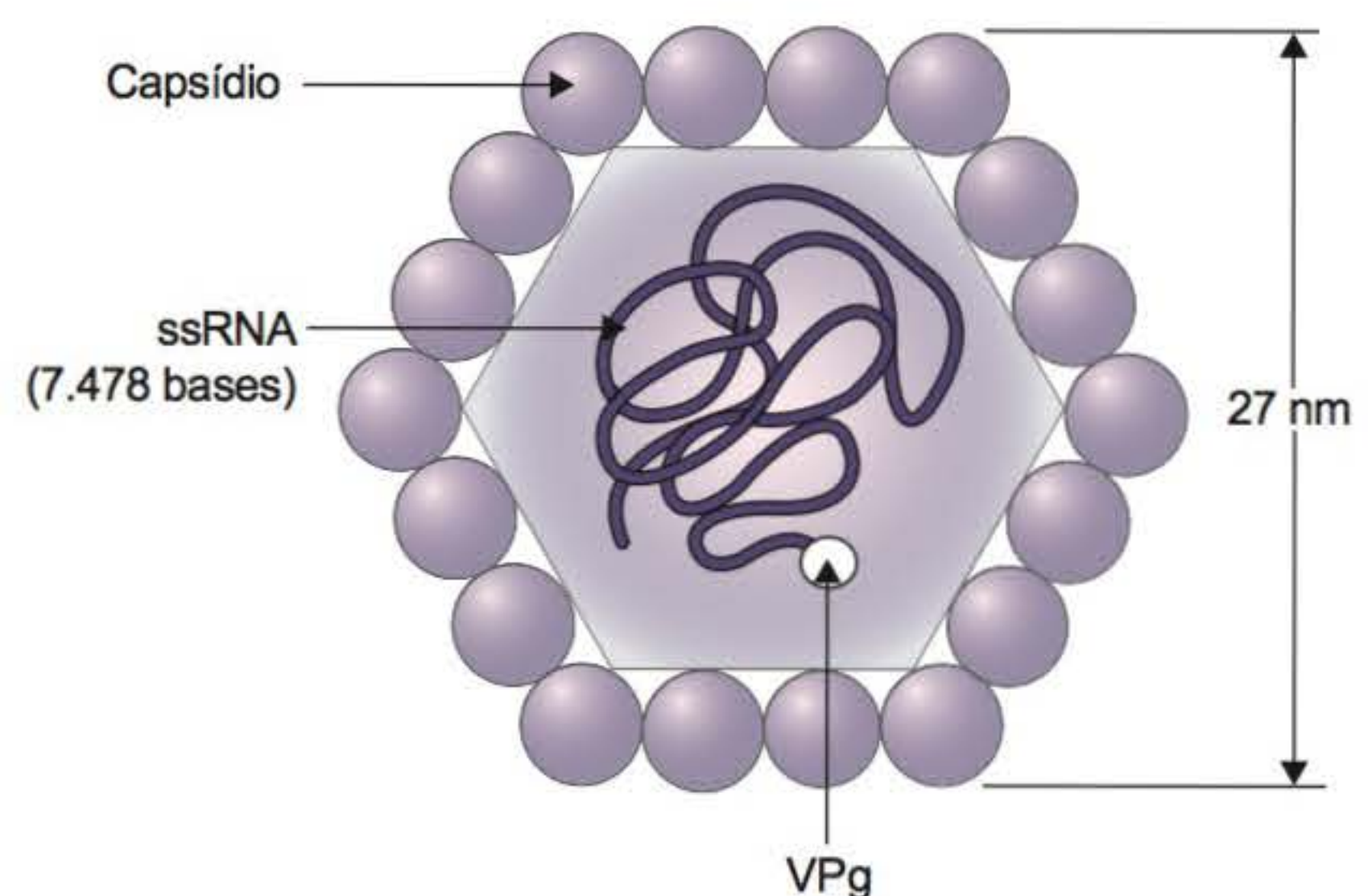
**Figura 6.1** Microscopia eletrônica do HAV isolado em fezes humanas.

em somente dois componentes, a proteína do capsídio e o RNA viral (Figura 6.2). O genoma é constituído por uma molécula de RNA positivo, fita simples, linear, de aproximadamente 7,5 kilobases (kb) de comprimento, com uma fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína de 250 kilodáltons (kDa).

O genoma do HAV consiste em uma região não codificadora na extremidade 5' (NCR) de 732 a 740 nucleotídeos, que está ligada covalentemente à proteína VPg. Nessa região podem ser encontradas as seis principais estruturas secundárias dominantes.<sup>9</sup> A região NCR na extremidade 3' tem 40 a 80 nucleotídeos ligados a uma cauda poli A. A região codificante do genoma viral é composta de uma fase de leitura aberta (ORF) que é traduzida em uma poliproteína (PO) de 2.227 aminoácidos, que, por meio de clivagem por proteólise se transforma na proteína viral madura. Essa região é dividida em P1, que compreende as proteínas do capsídio 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) e 1D (VP1) e em regiões P2 e P3, que englobam as proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C e 3A, 3B e 3C), reguladoras da expressão gênica e que são necessárias para a replicação viral (Figura 6.3).<sup>9</sup>

Dentro do citoplasma inicia-se a montagem do vírion pela associação das proteínas estruturais VP0 (formado pelo VP2 e pelo VP4), VP1 e VP3, que formam um complexo iniciador com coeficiente de sedimentação 5S. A união dessas estruturas forma um pentâmero de 14S, 70S (capsídio completo) e 140S (partícula completa). Depois dessa fase há formação de anticorpos neutralizantes contra os principais epitopos conformacionais das proteínas estruturais.<sup>10</sup>

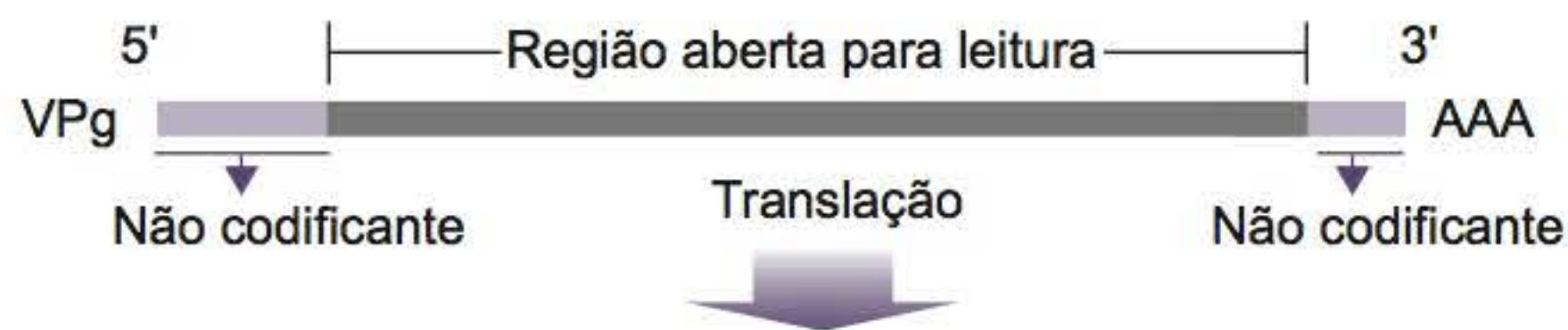
Em animais de experimentação, vírus vazios (partículas de 14S e 70S) mostraram-se antigênicos, induzindo a formação de anticorpos neutralizadores, e eficazes quando usados em testes imunoenzimáticos para diagnóstico da infecção. O uso desses antígenos parece ser promissor na produção de vacinas e testes imunoenzimáticos com proteínas recombinantes.<sup>11</sup>



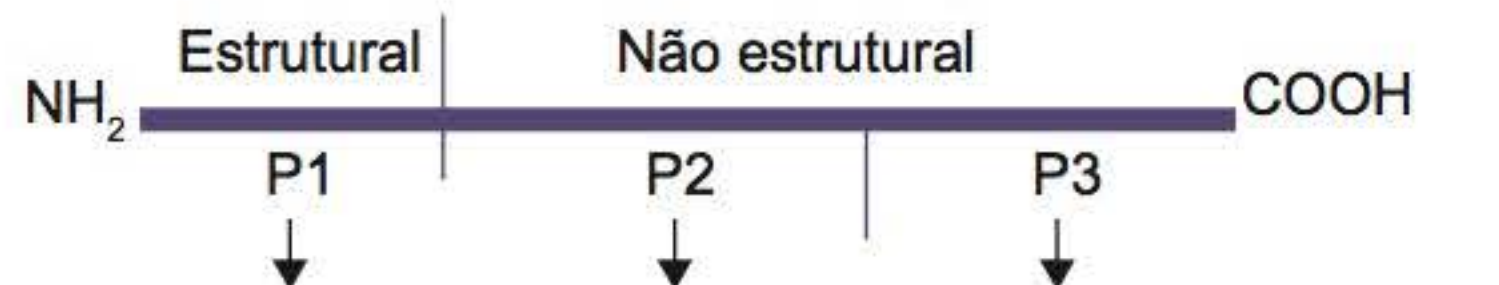
**Figura 6.2** Representação esquemática do HAV.<sup>8</sup>



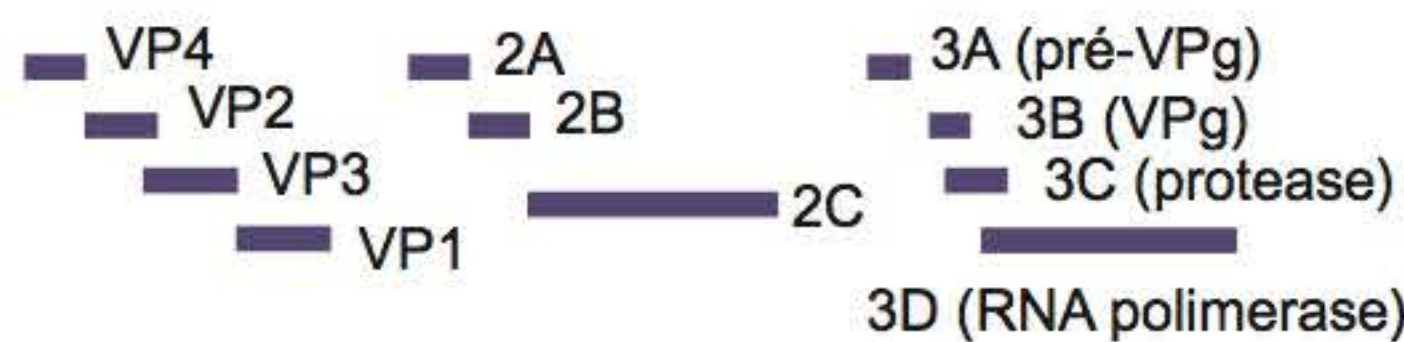
• RNA do HAV



• Polipeptídeo do HAV



• Proteínas



**Figura 6.3** Esquema do RNA do HAV e as suas principais proteínas.<sup>10</sup>

## • Transmissão

Após ingestão do HAV, supõe-se que ele seja conduzido através do epitélio intestinal por um processo de transporte vetorial ainda não bem conhecido. O fígado é somente um órgão-alvo de lesão e a replicação genômica ocorre no citoplasma do hepatócito por um mecanismo que envolve uma RNA polimerase RNA-dependente. Do fígado o HAV é transportado através dos ductos biliares para o intestino e, por ser resistente à inativação pelas enzimas proteolíticas, biliares e intestinais, alcança as fezes facilitando a transmissão oro-fecal. Essa é a principal via de transmissão e ocorre pela água e por alimentos contaminados por fezes de indivíduos infectados pelo vírus. Essa via acomete normalmente crianças que desenvolvem a doença no tipo subclínico, sendo por esse motivo os principais reservatórios desse agente. A transmissão do vírus é mais comum quando há contato íntimo e prolongado de doentes com indivíduos suscetíveis à infecção. Os adultos, na maioria das vezes, podem adquirir a doença quando em contato com crianças infectadas em regiões nas quais há falta de infraestrutura, com comprometimento do saneamento básico e, conseqüentemente, da higiene. Com a melhoria da infraestrutura, diminui a contaminação infantil, e o perfil da infecção passa a ser deslocado para indivíduos de outras faixas etárias, nos quais a doença é sintomática. A transmissão sanguínea é rara, pois o doador deve estar na fase virêmica prodrômica da infecção ao doar sangue.<sup>8</sup> Pode ocorrer a transmissão em hemofílicos que receberam fator VIII, pois o processo de inativação com detergentes e solventes não atua por completo no vírus.<sup>12</sup> Como a VO é a principal fonte de infecção e o vírus é resistente ao pH ácido para sobreviver no trato gastrointestinal, o tratamento das verduras com ácido acético (vinagre) não elimina o vírus.<sup>13</sup> A vacinação contra o HAV, paralelamente a melhores condições de higiene, pode prevenir e impedir sua disseminação. Aos viajantes para áreas de grande endemicidade, recomendam-se medidas gerais de higiene tais como higienização das mãos, cuidados com água, gelo, frutas, verduras cruas e mariscos inadequadamente cozidos,<sup>14</sup> além da vacinação específica, a melhor maneira de se prevenir a doença.

## • Evolução clínica

A hepatite A tem um período de incubação de aproximadamente 15 a 45 dias. A infecção pode ocorrer de maneira esporádica, endêmica ou epidêmica. A maneira esporádica pode ocorrer em crianças e adultos; no caso da epidêmica, em regiões de maior prevalência, as crianças são as mais atingidas, e nas regiões de menor prevalência, as infecções predominam em jovens e adultos. A infecção pode ser assintomática ou sintomática, icterica ou anictérica. Quando surgem os sintomas, são indistinguíveis dos outros tipos de hepatites, com exceção da diarreia que ocorre na fase aguda em 60% das crianças e 20% dos adultos. O vírus é excretado nas fezes, no final do período de incubação e na primeira semana da doença, alcançando uma concentração de  $10^8$  partículas infecciosas por mL.<sup>15</sup> Essas partículas permanecem viáveis nas fezes por 30 dias depois de secas e após congelamento.<sup>13</sup>

O HAV é relativamente resistente ao calor, éter ou ácido. É inativado pela fervura (20 min), pela formalina (1: 4.000 a 37°C por 72 h) por micro-ondas, pela utilização de cloro (1 ppm por 30 min) e pela radiação ultravioleta.<sup>8</sup>

## • Epidemiologia

O HAV é encontrado mundialmente, e a prevalência da infecção está diminuindo em países com alto padrão de higiene.<sup>8</sup> Em áreas urbanas de países com boas condições sanitárias, apenas 30% dos adultos têm anticorpos IgG contra HAV; já em países subdesenvolvidos, 90% das crianças com aproximadamente 10 anos apresentam imunidade. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), a estimativa de infecção pelo HAV no Brasil é de aproximadamente 130 casos novos por 100.000 habitantes ao ano.<sup>16</sup> Com a melhoria das condições sanitárias no Brasil, o número de crianças suscetíveis tem aumentado entre todas as classes sociais. Essa mudança no padrão epidemiológico da hepatite A acontece também em várias regiões do mundo, o que tem levantado a discussão sobre a vacinação em adolescentes e adultos jovens, já que clinicamente essa hepatite é branda em crianças e grave e prolongada em adultos.<sup>10</sup>

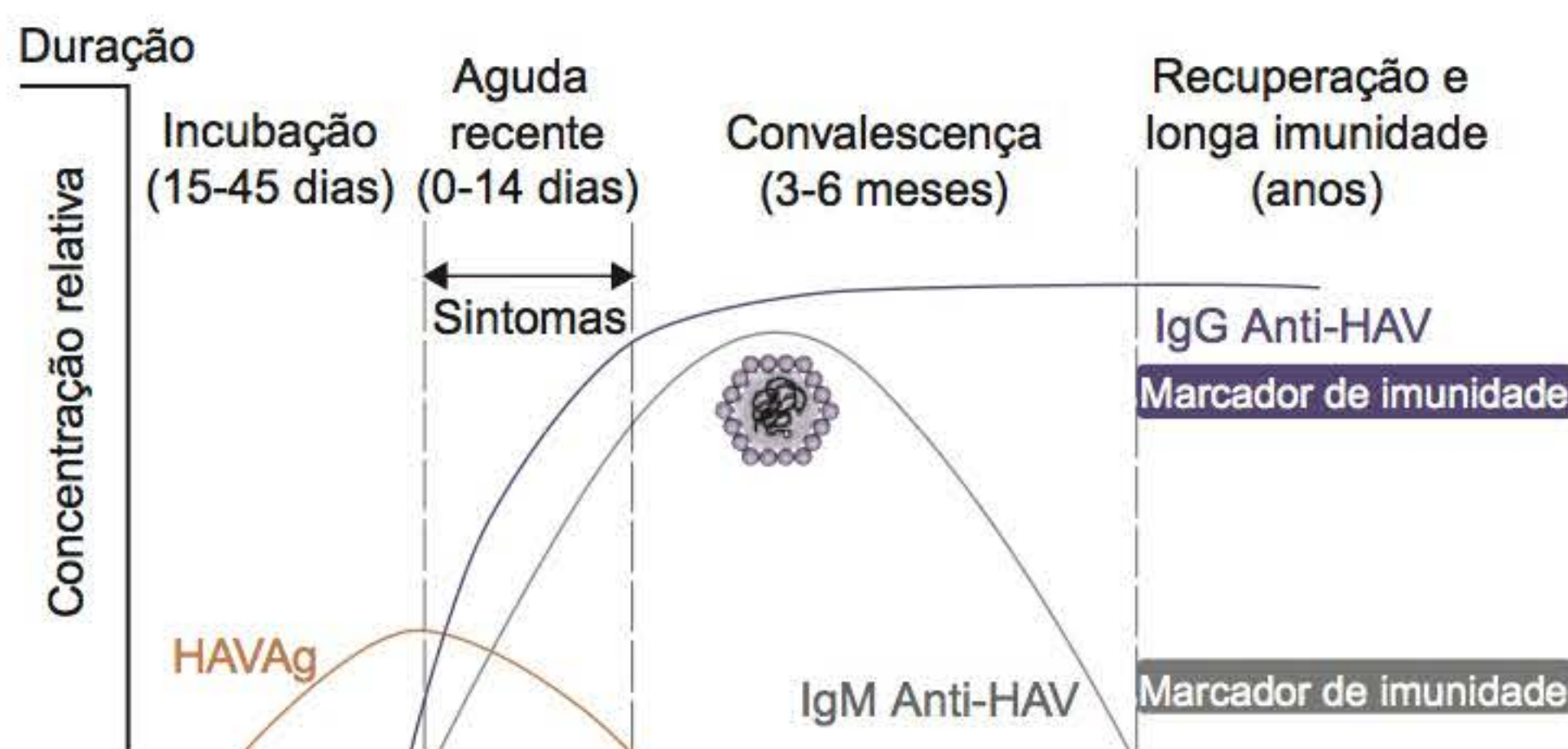
## • Diagnóstico

O HAV induz respostas imunes humoral (anticorpos) e celular, ambas importantes nos mecanismos de defesa.<sup>17</sup> Ensaio sorológicos comerciais estão disponíveis para o diagnóstico da infecção pelo HAV. Esse diagnóstico é realizado pela pesquisa de anticorpos específicos anti-HAV IgM (infecção aguda) e anti-HAV IgG (infecção corrente ou passada) em soro ou plasma humano. Os testes mais utilizados são os imunoenzimáticos (ELISA), de micropartículas (MEIA), imuno-fluorescentes (ELFA) e os quimioluminescentes.

No início da infecção os pacientes são reagentes para anticorpos IgM anti-HAV e permanecem positivos por cerca de 4 meses, portanto, na fase aguda, a presença de IgM específica para HAV confirma o diagnóstico. Os anticorpos IgG anti-HAV são detectados também no início da infecção, assim como após imunização, e permanecem por toda a vida (Figura 6.4).

Os kits disponíveis detectam anticorpos totais anti-HAV (IgG e IgM), portanto resultados positivos para esse kit e negativos para IgM anti-HAV significam infecção passada ou resposta vacinal. Ausência de qualquer tipo de anticorpos anti-HAV indica suscetibilidade à infecção.<sup>8</sup>





**Figura 6.4** Marcadores da infecção pelo HAV.

## ■ Prevenção

A prevenção da hepatite A depende de cuidados gerais de higiene e de imunoprofilaxias passiva e/ou ativa. A profilaxia passiva é feita com injeção intramuscular de gamaglobulina A, antes da exposição, que evita 85 a 95% dos casos, ou até 2 semanas após a exposição, para prevenir ou atenuar a infecção. A imunoprofilaxia ativa é feita com a utilização de vacina produzida com vírus inativado pela formalina. Atualmente, já existe uma vacina que associa os antígenos virais dos vírus A e B com eficácia comprovada.<sup>11</sup> A vacina da hepatite A é uma das mais imunogênicas e de excelente eficácia em profilaxia pré-exposição. A vacinação tem sido utilizada em surtos epidêmicos e na prevenção de casos secundários. A implementação dessa vacina em crianças e adolescentes parece ser o meio mais eficaz de controle da infecção, principalmente em regiões nas quais os surtos recorrentes representam um grave problema de saúde pública.

## ► Hepatite B

A hepatite B é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo. Estima-se que 2 bilhões de pessoas tenham sido infectadas pelo vírus da hepatite B (HBV) e mais do que 350 milhões tenham infecções hepáticas crônicas a longo prazo. Cerca de 1 milhão de pessoas morrem de doença hepática crônica, incluindo cirrose e câncer.<sup>18</sup>

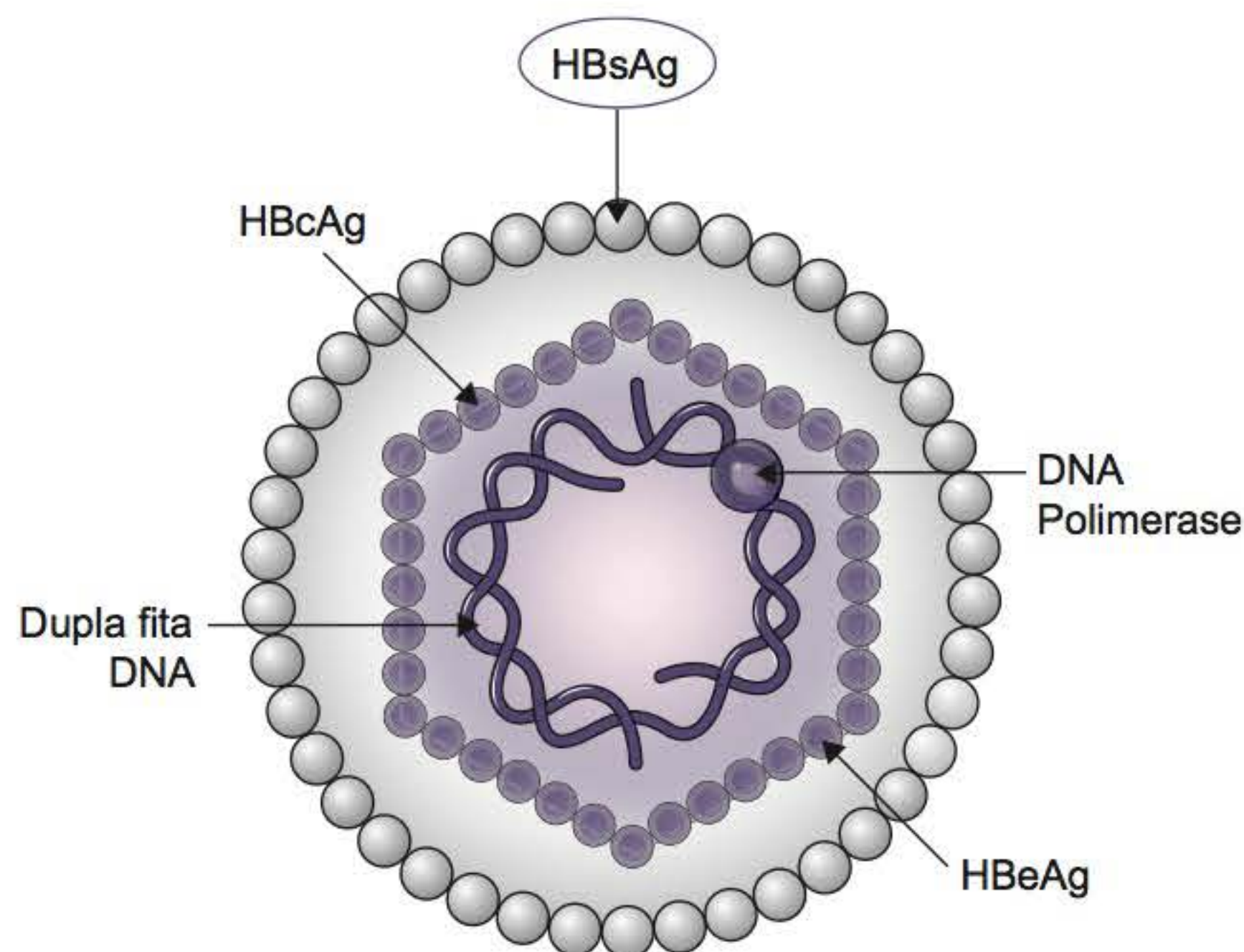
A infecção pelo HBV ficou conhecida por resultar em uma doença aguda e crônica do fígado e, por volta de 1970, esse vírus foi considerado como a possível causa do câncer hepático. É classificado dentro da família Hepadnaviridae e esse nome se deve ao HBV ser hepatotrópico e ter um genoma constituído por DNA.<sup>19</sup> Os membros dessa família não são citotóxicos e as infecções aguda e crônica do HBV são resultantes do mecanismo de defesa do hospedeiro contra o vírus, resultando na morte das células que expressam as proteínas do HBV. Muitos pacientes com hepatite crônica recuperam-se espontaneamente, enquanto outros desenvolvem doença hepática grave e progressiva. Outros ainda adquirem a doença de maneira silenciosa, que pode ou não progredir lentamente.

## ■ Características e constituição genômica do HBV

O HBV é uma partícula esférica de 42 nm de diâmetro, envelopada, que apresenta em seu interior um genoma constituído por DNA circular, fita dupla parcial e fita dupla simples, que replica por intermédio de um RNA intermediário,<sup>20</sup> com apro-

ximadamente 3.200 pares de bases (Figura 6.5). O capsídio é icosaédrico, envelopado por dupla camada lipídica na qual estão ancoradas as três diferentes proteínas de superfície.<sup>21</sup> Além disso, apresenta partículas esféricas e cilíndricas de 22 nm de diâmetro, constituídas apenas pelo envelope viral. A cadeia mais longa (negativa) é completa e a menor (positiva), incompleta.

O HBV é pequeno e apresenta quatro cadeias de leitura aberta (ORF, *open reading frames*) codificadas pelos genes S (superfície), P (polimerase), C (*core*) e X. O gene S é constituído por três regiões: pré-S1 ou p39, pré-S2 ou p33, S ou p25, que codificam a principal proteína do invólucro do vírus (HBsAg). As proteínas L (*large*) e M (*medium*) contêm os antígenos correspondentes às regiões pré-S1 e pré-S2 do genoma viral, além de compartilharem as regiões antigênicas do S (*small*). O gene C codifica duas proteínas: na região pré-C/C uma proteína solúvel, antígeno e (HBeAg), e na região C a proteína do nucleocapsídio (*core*) (HBcAg). O gene P codifica enzimas essenciais para replicação viral, como a DNA polimerase e a RNase H. A função da região X ainda é desconhecida (Figura 6.6). A partícula viral completa é denominada partícula de Dane, que é o tipo infectante encontrado no plasma (Figura 6.7A).<sup>2</sup> As formas circulares e tubulares produzidas durante a replicação viral são constituídas apenas de HBsAg e não são infectantes, já que não têm outros componentes genéticos (Figura 6.7B).



- Parcial fita dupla de DNA em forma circular
- Um membro da família Hepadnaviridae

**Figura 6.5** Representação esquemática do HBV.<sup>20</sup>



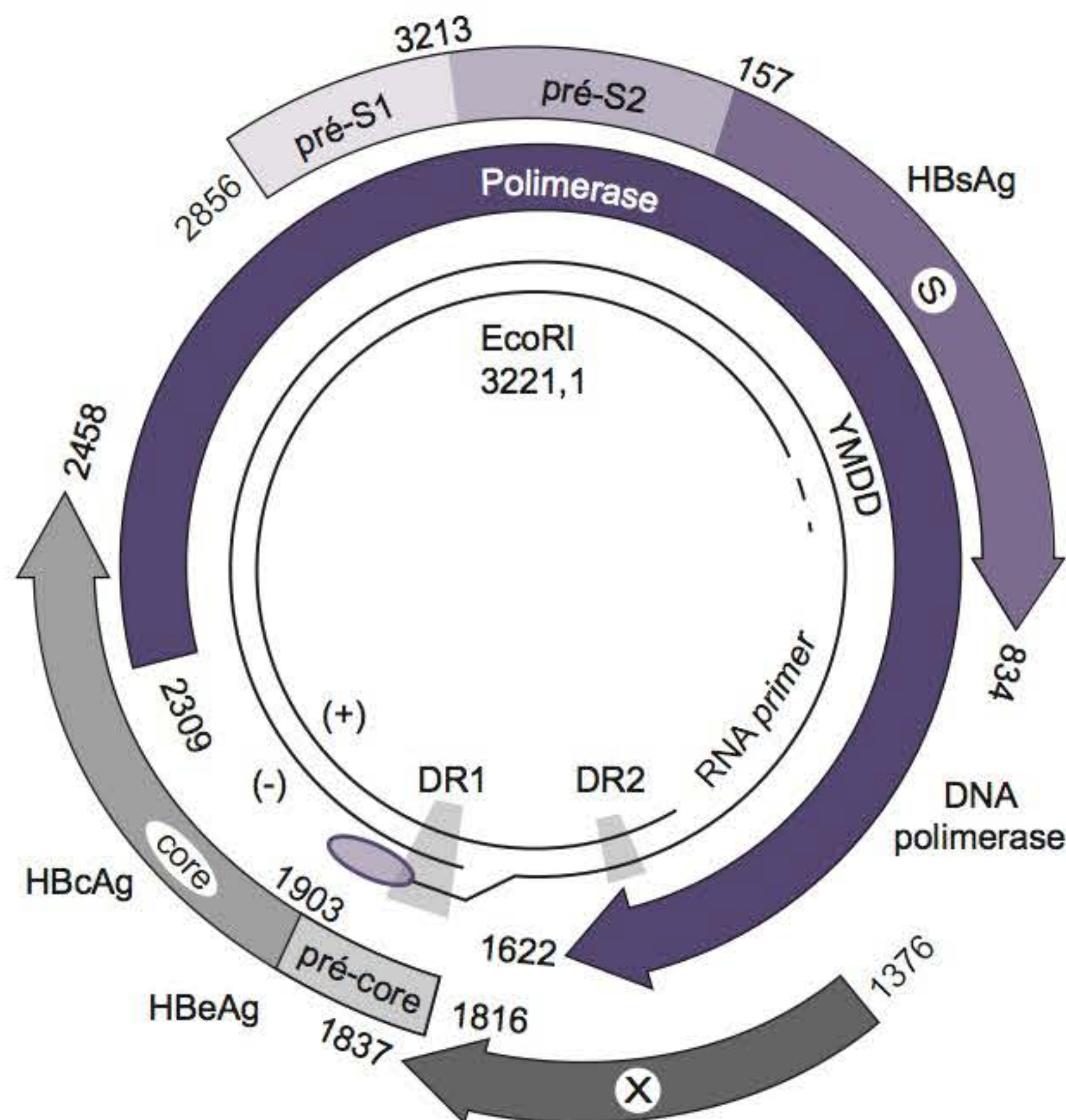


Figura 6.6 Genoma do HBV.<sup>20</sup>

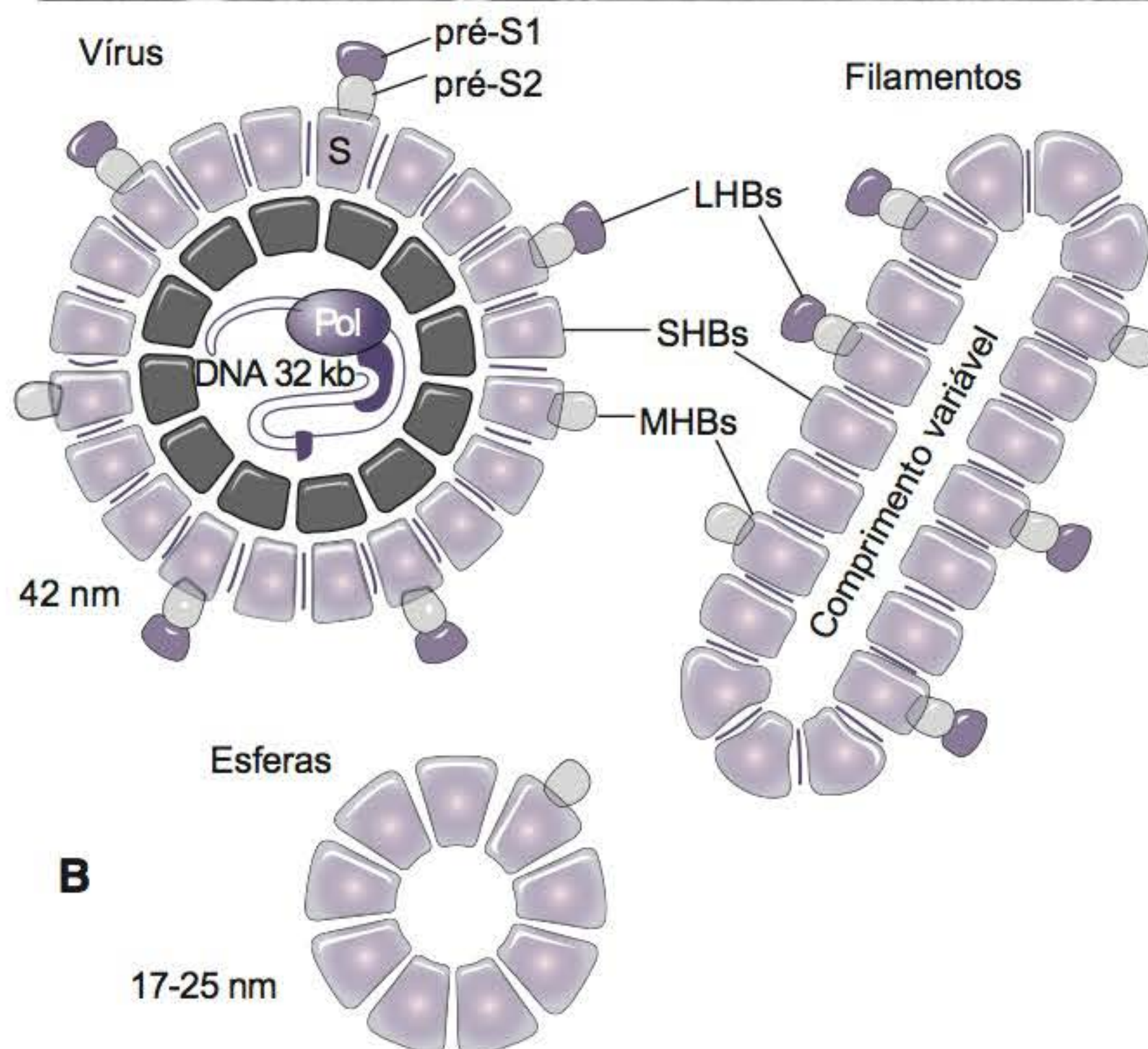


Figura 6.7 A. HBV: partícula de Dane (1); esféricas (2); filamentosas ou tubulares (3). B. Diagrama esquemático das partículas do HBV.<sup>31</sup>

## Subtipos do HBsAg

Logo após a descoberta do HBsAg, a heterogeneidade sorológica tornou-se aparente. Os quatro principais determinantes antigênicos do HBsAg podem ser distinguidos pelos anticorpos que reconhecem os diferentes epitopos das partículas formadas pelo HBsAg (SHBs). Todos os subtipos conhecidos contêm o determinante "a", uma sequência peptídica do HBV localizada entre os resíduos de aminoácidos 121 a 149 (Figura 6.8). A diferença entre os determinantes subtipo-específicos d/y e w/r é gerada pela troca de aminoácidos dos resíduos 122 e 160 de K a R, respectivamente. Subdeterminantes adicionais possibilitaram a diferenciação de quatro sorotipos de ayw e dois de adw e foram estabelecidos oito sorotipos (adr, ayr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2 e adw4) presentes nos vários genótipos do HBV.<sup>22</sup>

## Ciclo de replicação viral

A via de entrada nas pessoas suscetíveis, após exposição ao vírus, é a corrente sanguínea, por onde ele atinge o fígado, primeiro sítio de replicação do HBV. Não há nenhuma evidência de replicação na superfície da mucosa.<sup>19</sup> A replicação viral ocorre no citoplasma da célula, onde o RNA pré-genômico se associa ao HBcAg e à polimerase do HBV para formar a partícula do nucleocapsídeo.<sup>23</sup> O HBV, depois de se ligar no hepatócito e penetrar as células por intermédio da endocitose, perde seu envoltório e o seu DNA genômico entra no núcleo da célula. A cadeia pequena é completada pelo DNA endógeno e a cadeia longa é covalentemente fechada para a rcDNA (DNA circular relaxed) que posteriormente é convertida para

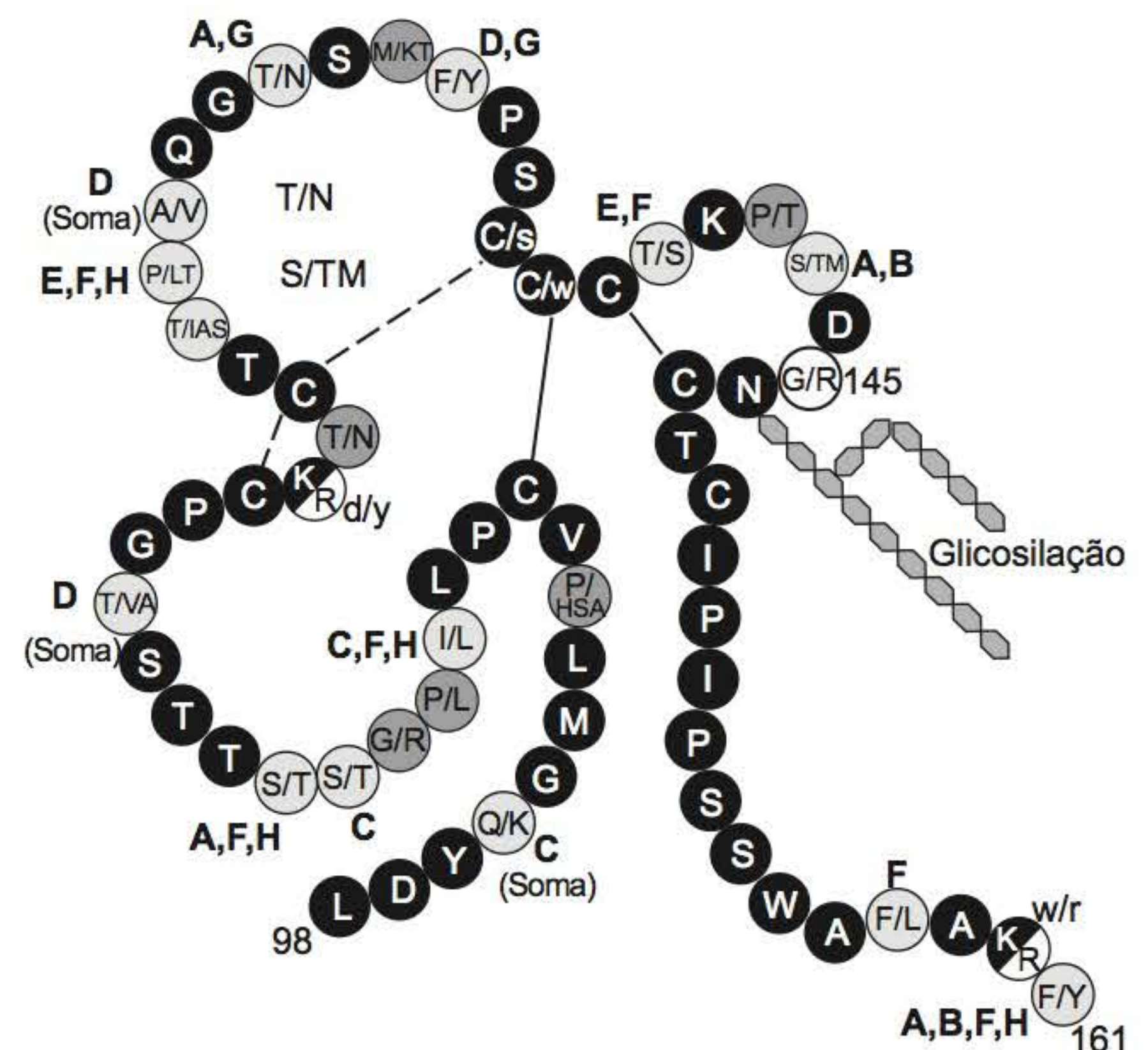


Figura 6.8 Modelo hipotético do determinante "a".<sup>22</sup> O determinante "a" é formado pela menor proteína de superfície do HBV. Resíduos de aminoácidos conservados são mostrados em preto e os não conservados em cinza. Se os resíduos estiverem variando especificamente no subtipo o genótipo é indicado em **negrito** ao lado do aminoácido. A posição G145, frequentemente descrita como variante de escape, é representada no círculo e semicírculos brancos (R). Resíduos 122 e 160, os quais conferem mudanças nos subtipos d/y e w/r, respectivamente. A figura está baseada no alinhamento de sequências de 166 HBs traduzidas a partir de 166 HBV tipo selvagem dos genomas do "GenBank".



cccDNA (*covalently closed circular DNA*, ou seja, DNA circular covalentemente fechado), as quais representam as formas replicativas do DNA HBV.<sup>24</sup>

O cccDNA, junto com as histonas celulares e outras proteínas nucleares, forma minicromossomos não integrados que servem como molde para a transcrição dos genes virais. O RNA pré-genômico, além de ser traduzido nas proteínas do nucleocapsídeo e na DNA polimerase, é encapsulado e transcrito reversamente para formar o DNA genômico. Uma peculiaridade do ciclo de vida desse vírus é que os nucleocapsídeos recém-formados podem voltar para o núcleo para amplificar e manter o *pool* de cccDNA ou serem envelopados e secretados para o sangue, onde novas partículas virais podem infectar outros hepatócitos.<sup>25</sup> Durante a infecção, o cccDNA se acumula no núcleo das células, em média de 5 a 50 cópias por célula. Como o cccDNA é um molde transcricional da infecção pelo HBV, tem papel primordial na persistência viral, tanto na reativação da replicação após o término da terapia antiviral como na falha terapêutica.<sup>26</sup>

O HBV não é diretamente citopático, as lesões hepáticas que aparecem durante a infecção crônica em geral são atribuídas à resposta imunológica do hospedeiro, pois tanto os componentes celulares quanto humorais são necessários para a eliminação do vírus, principalmente a ação de linfócitos T citotóxicos (CD8+) dirigidos contra os antígenos do core.<sup>27</sup>

## ■ Marcadores virais

Os antígenos que compõem o HBV, assim como seus respectivos anticorpos produzidos durante o curso da infecção, são conhecidos como marcadores do HBV e auxiliam na compreensão da evolução da infecção. O HBsAg é o primeiro marcador a aparecer e é detectado de 35 a 45 dias após a infecção. Na parte central do vírus encontra-se o HBcAg e dentro dele o DNA e a enzima DNA polimerase. O HBcAg não é detectado livre no soro. O anticorpo IgM anti-HBc aparece na fase aguda da infecção, caracterizando, portanto, indivíduos recentemente infectados. O anticorpo IgG anti-HBc aparece em seguida ao IgM e pode permanecer por toda a vida.<sup>28</sup>

O HBeAg secretado pelo antígeno do core é uma proteína solúvel não estrutural que é exportada para circulação periférica após o processo de tradução e está associada à replicação viral. Pode ser detectado logo após o aparecimento do HBsAg. O anticorpo contra o HBe (anti-HBe) é produzido para neutralizar o HBeAg, e o seu aparecimento indica diminuição da replicação

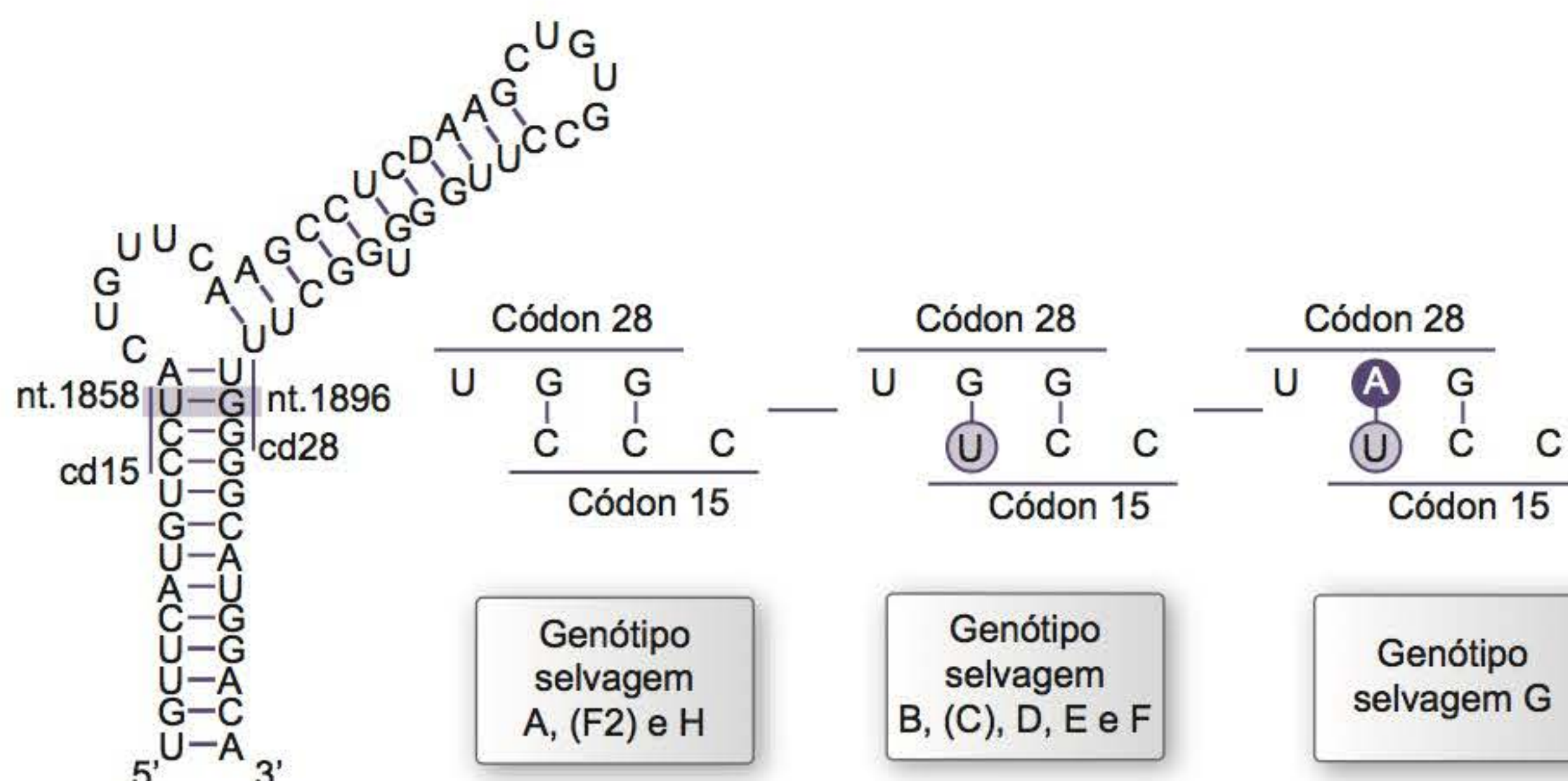
viral. O anti-HBe torna-se detectável após o desaparecimento do HBeAg.<sup>29</sup> O anti-HBs é um anticorpo neutralizante e seu aparecimento indica imunidade para a infecção do HBV, seja pela aquisição da infecção ou devido à imunização.<sup>20</sup>

## ■ Polimorfismo genético do HBV

Como o HBV se replica assimetricamente por meio de transcrição reversa de um RNA intermediário, ele se torna propenso a mutações. Entre as principais mutações do HBV de interesse clínico estão as do gene core/pré-core, do *core promoter*, do gene da polimerase e da região do envelope. As variantes mais comuns que ocorrem naturalmente no HBV incluem a mutação pré-core no *stop codon* (G<sub>1896</sub>A), que suprime a produção do antígeno “e” (HBeAg), e a dupla mutação no núcleo na região promotora do core (A<sub>1762</sub>T e G<sub>1764</sub>A) que estabelece e regula sua produção.<sup>20</sup> Essas variantes são encontradas em pacientes com hepatite crônica negativos para o HBeAg, em que a replicação do HBV e a inflamação hepática persistem apesar da ausência de HBeAg. A seleção da variante pré-core é dependente do genótipo, sendo mais comum na variante D e rara em pacientes com genótipo A.<sup>30</sup> Já a frequência de anti-HBe positivo na hepatite B crônica é determinada pela troca C/U na posição 1858. A troca de C1858 para U1858 favorece a mutação de G1896 para A1896. Essa dupla mutação pode formar uma base estável entre estes dois nucleotídeos no *stem loop* no sinal de encapsulação do vírus pré-genômico. Essas mudanças no códon 28 na posição A1896 do pré-core no *stop codon* impedem a tradução do HBeAg (Figura 6.9).<sup>22</sup>

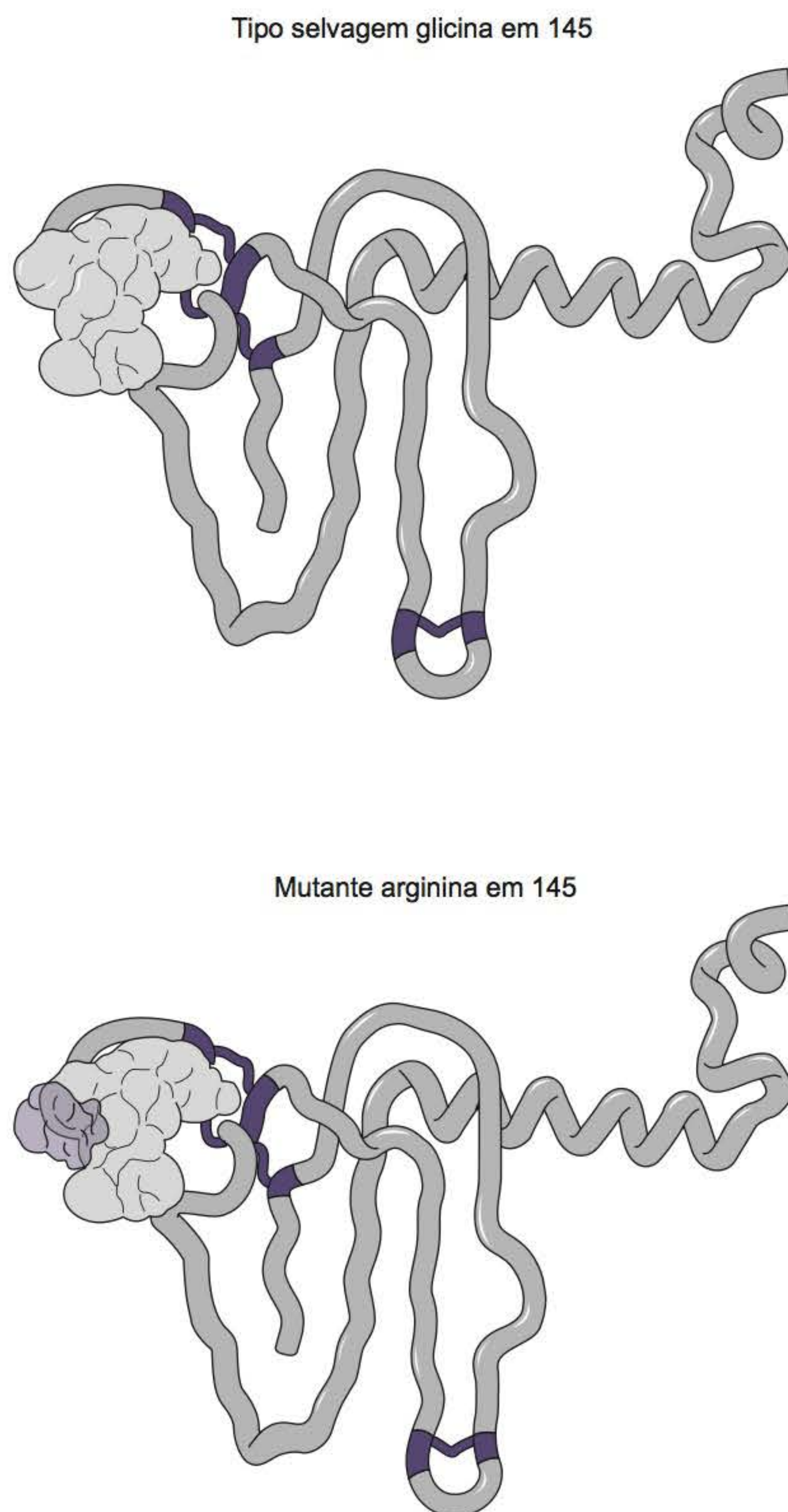
Outra mutação importante ocorre no gene S, no determinante “a”, onde o aminoácido (aa) glicina é substituído pela arginina no códon 145 (G<sub>145</sub>R) (Figura 6.10). O paciente que tem essa mutação pode apresentar o teste sorológico para HBsAg negativo. Outras mutações nessa região podem se manifestar da mesma maneira. As vacinas não são capazes de proteger os indivíduos com essas variantes do HBV, já que os anticorpos neutralizantes são direcionados ao determinante “a” (Figura 6.8).

Na região da polimerase frequentemente têm sido encontradas mutações, mas seu significado clínico permanece incerto. Entretanto, algumas mutações selecionadas pelo uso de antivirais resultam no aparecimento de formas do HBV circulantes com reduzida sensibilidade à resposta ao tratamento com análogos de nucleos(t)ídeos (AN). O padrão de mutantes resistentes do HBV varia pela classe química dos AN, que podem



**Figura 6.9** Mutações pré-core no *stop codon* (G<sub>1896</sub>A), que suprime a produção do antígeno “e” (HBeAg).





**Figura 6.10** Mutação importante no determinante "a" do gene S, em que ocorre uma substitui o do aminoácido glicina pela arginina no códon 145 (G<sub>145</sub>R).

ser classificados em L-nucleos dios (p. ex., lamivudina), fosfonatos de nucleos dios acíclicos (p. ex., adefovir e tenofovir) e ciclopentenos (p. ex., entecavir). A muta o de resistência t pica da lamivudina envolve as substitui es na região conservada tirosina-metionina-aspartato-aspartato (YMDD) da região responsável pelo sítio catalítico da transcriptase reversa para "YIDD" e é comumente encontrada em pacientes em terapêutica prolongada com a lamivudina.<sup>32</sup>

O HBV apresenta substancial heterogeneidade genética. Os genótipos do HBV humano diferem entre si em mais de 8% na sequência de nucleotídios do genoma total e/ou acima de 4% no gene do HBsAg. A análise genética permitiu classificar o HBV em oito genótipos distintos (A-H) que apresentam diferentes distribui es geográficas e associa es com diferentes grupos de risco para infecção.<sup>33</sup>

Na região oeste da Amazônia brasileira, a endemicidade da infecção pelo HBV é muito alta e a distribui o dos genótipos varia de acordo com a situação geográfica do paciente

com HBV. O genótipo A subgenótipo A (AA) tem sido o mais comum (81,81%), seguido pelo genótipo F subgenótipo F2 (13,63%) e depois pelo genótipo D subgenótipo D1 (4,54%).<sup>34</sup>

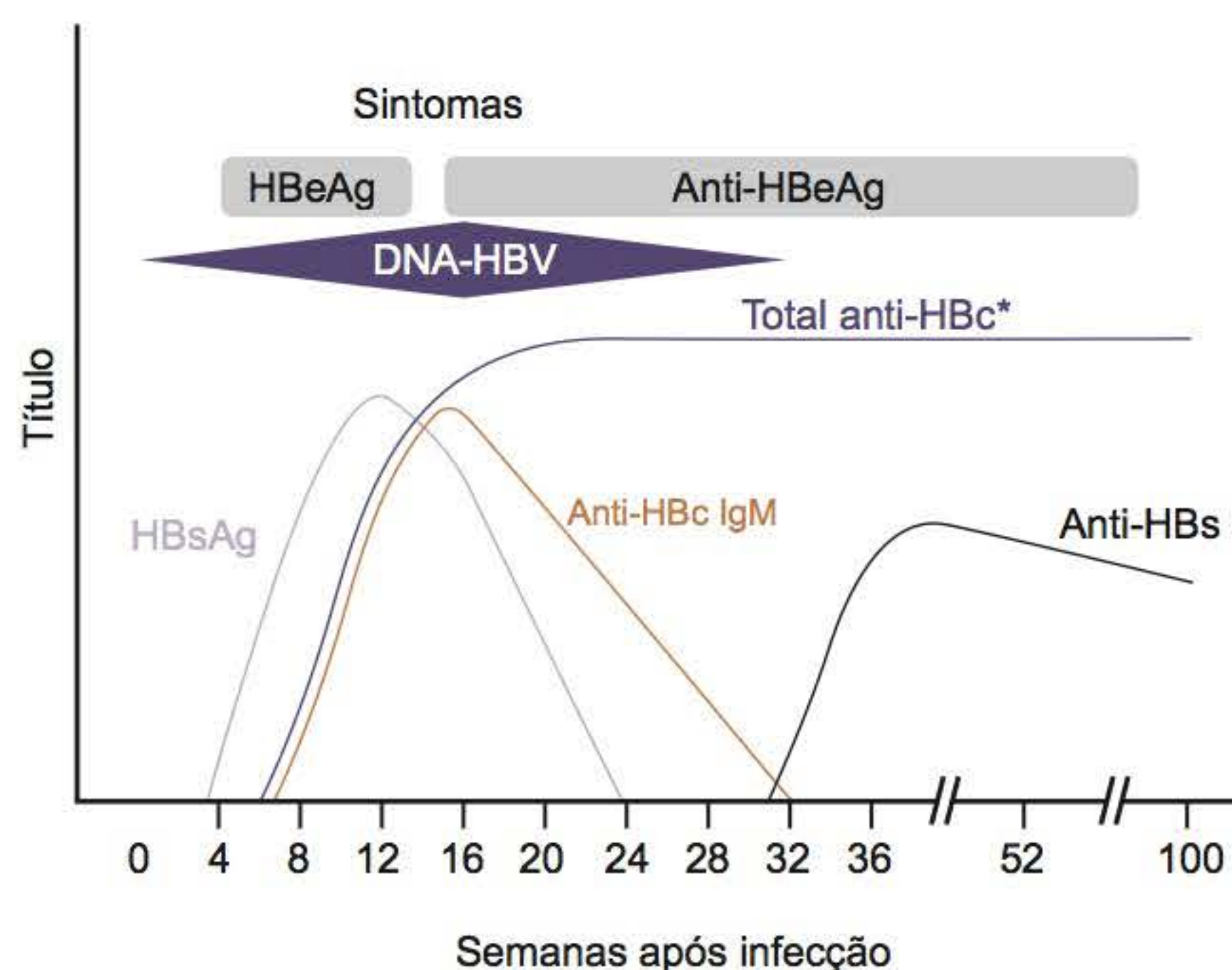
## Transmissão

A transmissão do HBV ocorre por via sanguínea, por meio de rela es sexuais e transmissão vertical, assim como por contato pessoa a pessoa, presumivelmente por cortes e feridas abertas, especialmente entre crianças em áreas hiperend micas.<sup>19</sup> O HBV é 50 a 100 vezes mais infeccioso do que o vírus do HIV e pode sobreviver pelo menos 7 dias fora do organismo humano.<sup>18</sup> Nesse período o vírus pode ainda causar infecção se entrar em contato com alguém não infectado. A hepatite B pode ser prevenida com vacina segura e eficaz.<sup>18</sup>

## Diagnóstico

### Infecção aguda pelo HBV

Nos indivíduos infectados pelo HBV, o primeiro marcador a ser detectado é o DNA viral, que pode aparecer até 23 dias antes do aparecimento do HBsAg. O período de incubac o da hepatite B aguda varia de 30 a 180 dias,<sup>35</sup> com duração média de 75 dias, e caracteriza-se pela presença do HBsAg e ausência de sintomas clínicos. O anti-HBc aparece dias depois do HBsAg. No momento em que surgem sintomas inespecíficos, ocorre elevação das transaminases e os anticorpos IgM e IgG anti-HBc estão presentes no soro.<sup>36</sup> Caso a infecção se resolva, cessa a replicação viral com eliminação do HBeAg e aparecimento do anti-HBe. Em geral o HBsAg desaparece até o 3  m s de doença e o anti-HBs, anticorpo neutralizante, passa a ser detectado. A infecção aguda pelo HBV pode apresentar dois períodos de janela imunológica: o primeiro   quando ainda não se detecta nenhum marcador imunológico, ou seja, antes do aparecimento do HBsAg, e apenas o DNA viral é detectado; e outro período   uma janela imunológica do HBsAg, quando este já não é mais detectado, mas ainda não se detecta o anti-HBs, nesta fase apenas o anticorpo IgM anti-HBc é detectado (Figura 6.11). Esse período tem diminuído com a melhora dos kits de detecção dos marcadores virais, mas é importante ressaltar que a pesquisa de IgM anti-HBc   necessária para que



**Figura 6.11** Evolução da hepatite B aguda.



se faça o diagnóstico de hepatite B aguda, na qual altos títulos desse anticorpo podem ser detectados. Na hepatite crônica, baixos títulos de IgM anti-HBc podem ser encontrados, principalmente na fase de exacerbação da infecção.

### Infecção crônica pelo HBV

A infecção crônica tem várias fases distintas sorológicas e virais. Nos estágios em que a replicação viral é baixa a incidência de lesões hepáticas está significativamente diminuída. A infecção crônica é caracterizada pela persistência do HBsAg por um período maior ou igual a 6 meses, pela presença do DNA-HBV e do HBeAg no soro.<sup>37</sup> O antígeno “e” e os anticorpos específicos (AgHBe/anti-HBe) estão relacionados com o índice de replicação viral e têm sua maior utilidade no estudo das formas crônicas de hepatites pelo vírus B. Pode ocorrer posteriormente a soroconversão do HBeAg para anti-HBe durante a evolução da doença. Os pacientes com infecção persistente pelo HBV são classificados como portadores sãos quando não há inflamação e doença hepática presentes, HBeAg negativo, anti-HBe detectável e DNA-HBV/ml menor que  $10^6$  cópias, transaminases normais e nenhum sinal histológico de HBV crônica. A infecção pelo HBV pode ocorrer sem manifestações aparentes conhecidas, na qual é possível a detecção do DNA-HBV com sorologia negativa para o HBsAg.<sup>37</sup>

A infecção crônica pelo HBV em crianças, adquirida no período perinatal, inicia-se por uma fase de imunotolerância que pode perdurar por 15 a 35 anos e caracteriza-se por elevados níveis de replicação do HBV, sem doença hepática ativa, altas concentrações de HBsAg e HBeAg no soro e DNA-HBV maior que  $10^9$  cópias/ml. O HBV não é diretamente citopático, e a lesão hepatocelular é causada pela atividade do sistema imunológico. Como nessa fase o sistema imune é tolerante, não há inflamação hepática mesmo com alta replicação viral e os níveis de transaminases são, portanto, normais.<sup>36</sup> Isso se deve provavelmente à indução de tolerância imunológica aos antígenos virais, pela passagem transplacentária do HBeAg da mãe para o feto, o que, associado à imaturidade imunológica, torna o feto/recém-nascido incapaz de montar uma resposta efetiva e eliminar o vírus.<sup>28</sup> A evolução dos marcadores de hepatite B crônica está ilustrada na Figura 6.12.

Os marcadores utilizados na triagem sorológica para prevenir a transmissão do HBV são o HBsAg e o anti-HBc. Os

testes para detecção do HBsAg permanecem de primeira linha para a triagem de doadores de sangue. Os mais utilizados são os imunoenaios, incluindo ensaios imunoenzimáticos e quimioluminescentes (CLIA). Esses ensaios têm um limiar de detecção entre  $< 0,1$  e  $0,62$  ng de HBsAg por ml ( $1$  ng/ml corresponde a aproximadamente  $2$  UI/ml)<sup>38</sup>. Nos EUA é obrigatório que os testes de HBsAg tenham um limiar de detecção de pelo menos  $0,2$  ng/ml. Tem sido observado que ocorrem diferenças na sensibilidade analítica e na especificidade de testes ELISA para a detecção do HBsAg entre os diferentes genótipos e subtipos.<sup>38</sup> Resultados falsos-negativos nesses testes também podem ser causados pela ocorrência de mutações na região do antígeno S com redução da síntese ou secreção do HBsAg ou pela presença concomitante de anticorpos contra o HBsAg (anti-HBs) que permitem a formação de imunocomplexos circulantes e impedem a captura do HBsAg pelos testes usuais.<sup>39</sup>

Pessoas que se vacinam contra o HBV devem ficar 1 mês sem doar sangue, pois o HBsAg proveniente da vacina pode ser detectado pelos testes de triagem.<sup>40</sup> O risco residual de transmissão do HBV por transfusão sanguínea é relatado principalmente em doadores negativos para HBsAg que tenham coletado o sangue na fase de pré-soroconversão (janela imunológica), período entre a infecção e a detecção do antígeno viral ou anticorpos.

Os kits sorológicos produzidos para a detecção do HBsAg utilizam anticorpos monoclonais dirigidos para o epitopo “a”.<sup>28</sup> Testes sorológicos aprimorados, com anticorpos contra outros epitopos do HBsAg, permitem a detecção de mutações que possam ocorrer no gene S<sup>41</sup> e, provavelmente, vacinas com outros antígenos do HBV, além do HBsAg, devem ser protetoras contra esses mutantes. A infecção causada por vírus mutantes derivados do vírus da HBV, na qual não se consegue detectar o HBsAg, atualmente é conhecida como hepatite B oculta ou críptica.<sup>42</sup>

A redução do risco residual pode ser obtida pela implantação de testes mais sensíveis para a detecção do HBsAg, do anti-HBc e do teste de ácido nucleico (NAT) para HBV. O NAT-HBV, além da redução da janela imunológica, possibilita a detecção da “infecção oculta” pelo HBV. O teste de anti-HBc utilizado na triagem sorológica de doadores de sangue tem o potencial de excluir a maioria dos casos de infecção oculta, restando apenas os casos mais raros ou de mutantes de escape imune associados ao anti-HBs isolado. Contudo, não consegue detectar infecções na fase de janela imunológica. Em média 0,5% das pessoas que apresentam sorologia positiva para o anti-HBc e negativa para o HBsAg têm resultados positivos na detecção do DNA viral e, por isso, tal teste é utilizado na triagem de bancos de sangue.<sup>38</sup>

A erradicação da infecção viral pode também ser dificultada pelo tipo infectante do vírus, o cccDNA, um tipo intermediário do ciclo de replicação que durante a mitose tende a se acumular no núcleo de hepatócitos e ser repartido entre as suas células-filhas.<sup>43</sup>

### Prevenção

Tanto a profilaxia passiva quanto a ativa, pós-exposição ao HBV, usando HBIG e vacina ou somente a vacina para o vírus B, são altamente eficazes na prevenção da infecção.<sup>19</sup> A imunização ativa ao HBV tem sido associada à diminuição acentuada de sua incidência e constitui também o melhor procedimento para a redução da prevalência e incidência da infecção pelo vírus da hepatite delta (HDV).<sup>44</sup>

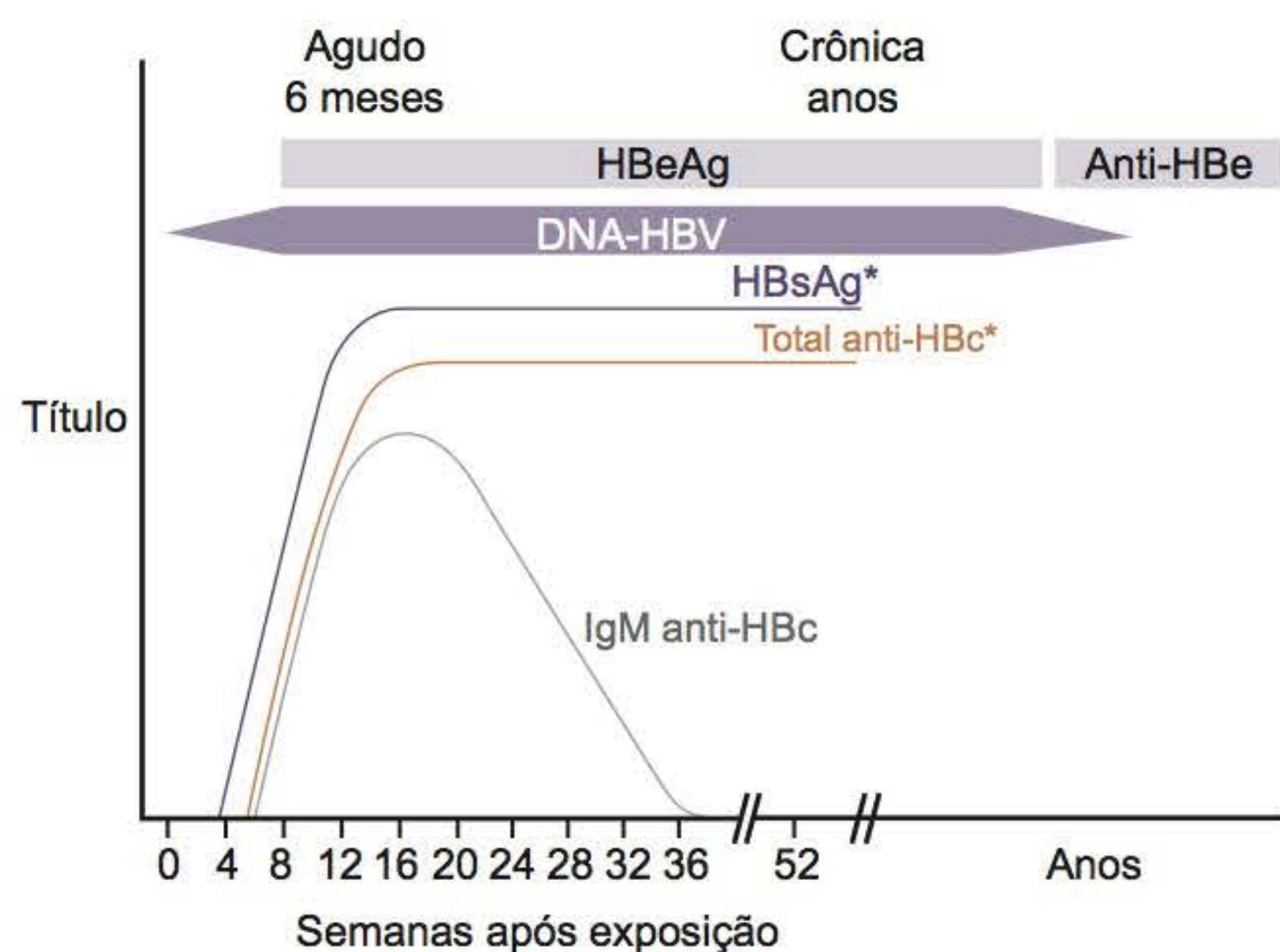


Figura 6.12 Evolução da hepatite B crônica.



### Esquema vacinal

O esquema habitual de vacinação para indivíduos imunocompetentes consiste em três doses, com intervalos de 1 mês entre a primeira e a segunda dose e 6 meses entre a primeira e a terceira dose (0, 1 e 6 meses). Para prevenir a transmissão do HBV perinatal, a primeira dose da vacina deve ser dada logo após o nascimento, de preferência dentro de 24 h (WHO, 2001). Prematuros menores de 33 semanas ou cujo peso não ultrapasse 2.000 g deverão receber uma dose extra com 2 meses de idade (0, 1, 2 e 6 meses).<sup>44</sup>

Em crianças as vacinas contra hepatite B devem ser administradas por via intramuscular, na região deltoide ou no vasto lateral da coxa. Não devem ser aplicadas na região glútea, pois a adoção desse procedimento se associa a menor imunogenicidade. Excepcionalmente, em pessoas com doenças hemorrágicas, a via subcutânea (SC) pode ser utilizada<sup>44</sup> (Figura 6.13). Três doses de vacina contra hepatite B induzem títulos protetores de anticorpos (anti-HBs  $\geq 10$  UI/mL) em mais de 90% dos adultos e jovens saudáveis, e em mais de 95% dos lactentes, crianças e adolescentes. A eficácia diminui em torno de 40 a 60% com o avançar da idade, principalmente a partir dos 40 anos.<sup>44</sup>

### Tratamento para hepatite B

Vários fatores podem influenciar a prescrição do tratamento, como, por exemplo, estágio da doença, detecção ou não do HBeAg, resistência ao medicamento, principalmente nos estágios finais da doença crônica do fígado<sup>45</sup> e persistência do cccDNA. O objetivo do tratamento é alcançar a “resposta

sustentada”, ou seja, a supressão da replicação viral do HBV e remissão da doença hepática<sup>46</sup> ativando a resposta imunológica. Para tal, deve ocorrer soroconversão do HBeAg para anti-HBe, queda ou diminuição dos níveis do DNA do HBV e soroconversão do HBsAg para anti-HBs.<sup>45</sup> O medicamento indicado para o tratamento da HBV é a interferona- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) que tem efeitos antiviral e imunomodulatório. Já o Ministério da Saúde no Brasil preconiza como primeira escolha a IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\alpha$ 2b. As IFN peguilladas  $\alpha$ 2a e  $\alpha$ 2b apresentam-se como alternativas interessantes para o tratamento da hepatite B por suas vantagens em relação à IFN convencional pelo prolongamento de sua meia-vida, podendo ser utilizadas apenas 1 vez/semana. O tratamento com IFN é contraindicado em pacientes com doença hepática descompensada, para os quais deve-se indicar preferencialmente os análogos de nucleos(t)ídeos (AN). O mais utilizado para o tratamento da hepatite B é a lamivudina, um medicamento muito barato, mas para o qual aparecem mutações de resistência em até 70% dos pacientes submetidos a tratamento prolongado. Portanto, muitas vezes é substituído por outros AN (4<sup>a</sup>). O adefovir dipivoxila é uma substância inibidora da replicação viral usada como alternativa à IFN ou à lamivudina para o tratamento da infecção crônica do HBV, apesar de seu efeito sobre esse vírus não ser tão potente. A escolha do tratamento com um desses fármacos deve ser baseada no estado individual do paciente.<sup>37</sup> Dois AN têm se mostrado bastante efetivos para o controle da infecção do HBV: o entecavir e o tenofovir, que são muito mais potentes que a lamivudina e o adefovir. Ademais, o aparecimento de mutações de resistência contra entecavir e tenofovir

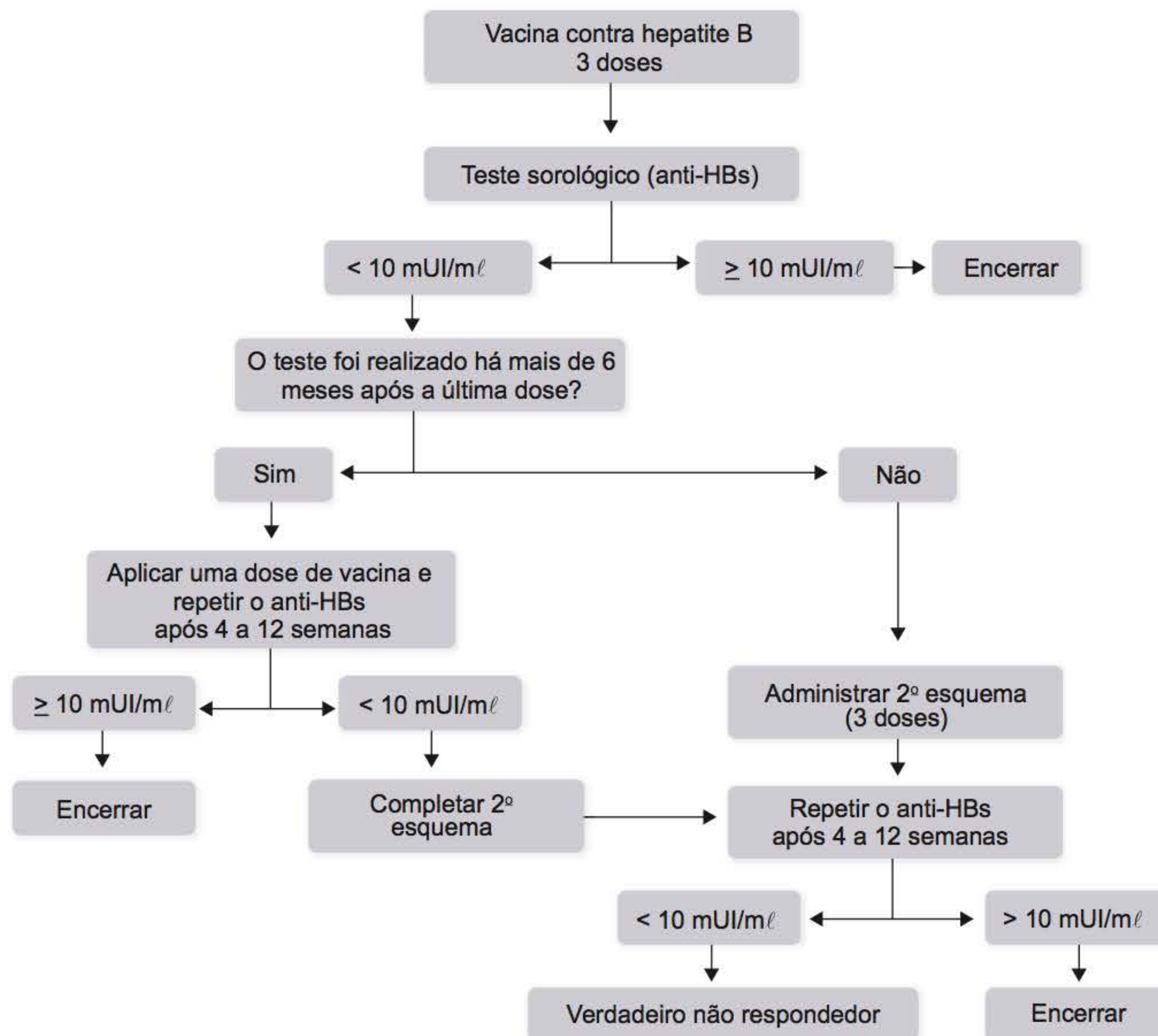


Figura 6.13 Esquema de vacinação para hepatite B.<sup>44</sup>



ocorre de modo muito menos frequente que as que aparecem com o uso de lamivudina e adefovir, sendo que essas substâncias devem ser incorporadas como primeira opção no tratamento da hepatite B. Em particular, as mutações de resistência ao entecavir são muito mais raras quando esse medicamento é utilizado como primeira opção de tratamento, mas tornam-se frequentes em pacientes previamente tratados com lamivudina. Já as mutações de resistência ao tenofovir ainda não estão muito bem definidas, mas esse é um medicamento de grande potencial para o tratamento da hepatite B, mesmo em pacientes que já tenham apresentado resistência prévia à lamivudina. Por enquanto o tratamento da hepatite B, ao contrário do tratamento de HIV/AIDS, ainda é feito preferencialmente com apenas um AN, exceto para pacientes com resistência à lamivudina, quando é indicado outro medicamento, o adefovir.

O tratamento da hepatite B pode, portanto, começar com IFN ou AN. Alguns autores têm proposto que o tratamento inicial de casos infectados com genótipos A e B deva ser feito com IFN, enquanto para os genótipos C e D a primeira opção deve ser um AN, de preferência de maior potência, como o entecavir ou o tenofovir. Assim, tem sido proposta por alguns autores a realização de exames de genotipagem do HBV e de determinação do aparecimento de mutações de resistência aos antivirais, para a indicação e acompanhamento do tratamento antiviral, em conjunto com a realização da carga viral do HBV.

As diretrizes mais recentes indicam o tratamento da hepatite B para todos os pacientes com carga viral maior que 2.000 UI/mL que apresentem ALT elevada e alterações na biopsia hepática maiores que A2 ou F2 pelo índice METAVIR.<sup>47</sup> Já os casos com cirrose hepática devem ser tratados sempre que o DNA viral for detectado no soro. A queda da carga viral deve ser monitorada pelo menos no terceiro e no sexto mês, bem como após 1 ano do tratamento, e a interpretação da resposta ao tratamento deve ser feita como apresentado no Quadro 6.1.

## ► Hepatite C

Desde o descobrimento dos agentes virais que causavam infecções conhecidas como hepatites A e B, a hepatite causada por outro agente viral era reconhecida por exclusão e chamada de hepatite não A não B (HNANB). A existência de um agente viral associado à HNANB foi reconhecida, experimentalmente, por Alter *et al.* em 1978,<sup>48</sup> quando, inoculando chimpanzés com plasma ou soro de pacientes com HNANB pós-transfusional, verificaram que eles reproduziam alterações bioquímicas e histológicas compatíveis com a HNANB.

No ano de 1989, Choo *et al.*,<sup>3</sup> pesquisadores da empresa Chiron Corporation (EUA), em colaboração com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, EUA), obtiveram uma proteína desse vírus que foi utilizada para a produção de um banco genômico de DNA complementar (cDNA). A partir de então foi possível conhecer o genoma do vírus que foi denominado vírus da hepatite C (HCV) e produzir antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos que foram utilizados na produção de kits sorológicos.

### ■ Transmissão

O HCV é um patógeno transmitido mais eficientemente pela exposição percutânea direta com o sangue infectado que pode ocorrer por várias vias, principalmente a parenteral. A transmissão por intermédio de transfusão de sangue e derivados, pelo transplante de órgãos, teve diminuição acentuada no Brasil após a introdução dos testes de anti-HCV em 1991. A transmissão sexual parece não ser muito eficiente e a vertical também é de baixo risco (< 6%), mas ambas são facilitadas na coinfeção com o HIV, mesmo em indivíduos sem fatores de risco.<sup>49</sup> O HCV não tem sido encontrado no leite materno.<sup>50</sup>

### ■ Patogênese

Cerca de um terço dos adultos desenvolvem sintomas clínicos e icterícia em torno de 3 a 12 semanas da infecção.<sup>51</sup> A infecção aguda é autolimitada, os sintomas permanecem por várias semanas e desaparecem com a redução dos níveis da alanina aminotransferase (ALT). O RNA do HCV pode ser detectado no sangue, pelas técnicas moleculares, em aproximadamente 15 dias após início da infecção.<sup>52</sup> Uma pequena porcentagem de pacientes (10 a 25%) clareia o vírus durante a fase aguda (6 primeiros meses após a infecção). Nessa fase, somente 50 a 70% dos pacientes são detectados por meio de anticorpos contra o HCV, pelas técnicas imunoenzimáticas, chegando a 90% em 3 meses. Portanto, durante a chamada janela sorológica ou período pré-soroconversão, um resultado sorológico negativo não exclui a possibilidade de infecção pelo HCV.<sup>53</sup>

A persistência do RNA do HCV por mais de 6 meses após a infecção caracteriza a infecção crônica.<sup>54</sup> O determinante mais importante para a infecção tornar-se crônica parece ser o aparecimento da quase espécie, uma população complexa que consegue evadir da resposta imune resultando na persistência do vírus. Este é um processo natural do HCV assim como de outros vírus RNA.<sup>55</sup> Além disso, verificou-se que nos soros humanos havia anticorpos neutralizantes para HCV, mas que

**Quadro 6.1 ■ Interpretação da resposta ao tratamento para hepatite B.**

Terapia	Perfil de resposta	Definição
Análogos de nucleos(t)ídeos	Sem resposta primária	Redução no nível do DNA-HBV sérico < 1 log <sub>10</sub> UI/mL em relação ao valor inicial no 3º mês de terapia
	Resposta virológica	DNA-HBV indetectável dentro das 48 semanas de terapia
	Resposta virológica parcial	Redução do DNA-HBV sérico > 1 log <sub>10</sub> UI/mL em relação ao valor inicial, mas DNA-HBV detectável, nas semanas 24 ou 48
	Recidiva virológica	Aumento do DNA-HBV sérico durante a terapia em > 1 log <sub>10</sub> UI/mL em comparação ao nadir
IFN-α	Sem resposta primária	Redução do DNA-HBV sérico < 1 log <sub>10</sub> UI/mL em relação ao valor inicial no 3º mês de terapia
	Resposta virológica	DNA-HBV < 2.000 UI/mL no 6º mês de terapia
	Resposta sorológica	Soroconversão para anti-HBe em pacientes HBeAg-positivos



eles eram altamente específicos para a cepa infectante e não protegiam contra outras variantes virais.<sup>56</sup> Aproximadamente 15 a 20% dos indivíduos infectados pelo HCV têm recuperação espontânea, geralmente dentro do primeiro ano da infecção, como demonstrado pela ausência do RNA do HCV em amostras sequenciais e normalização dos níveis de ALT.<sup>55</sup>

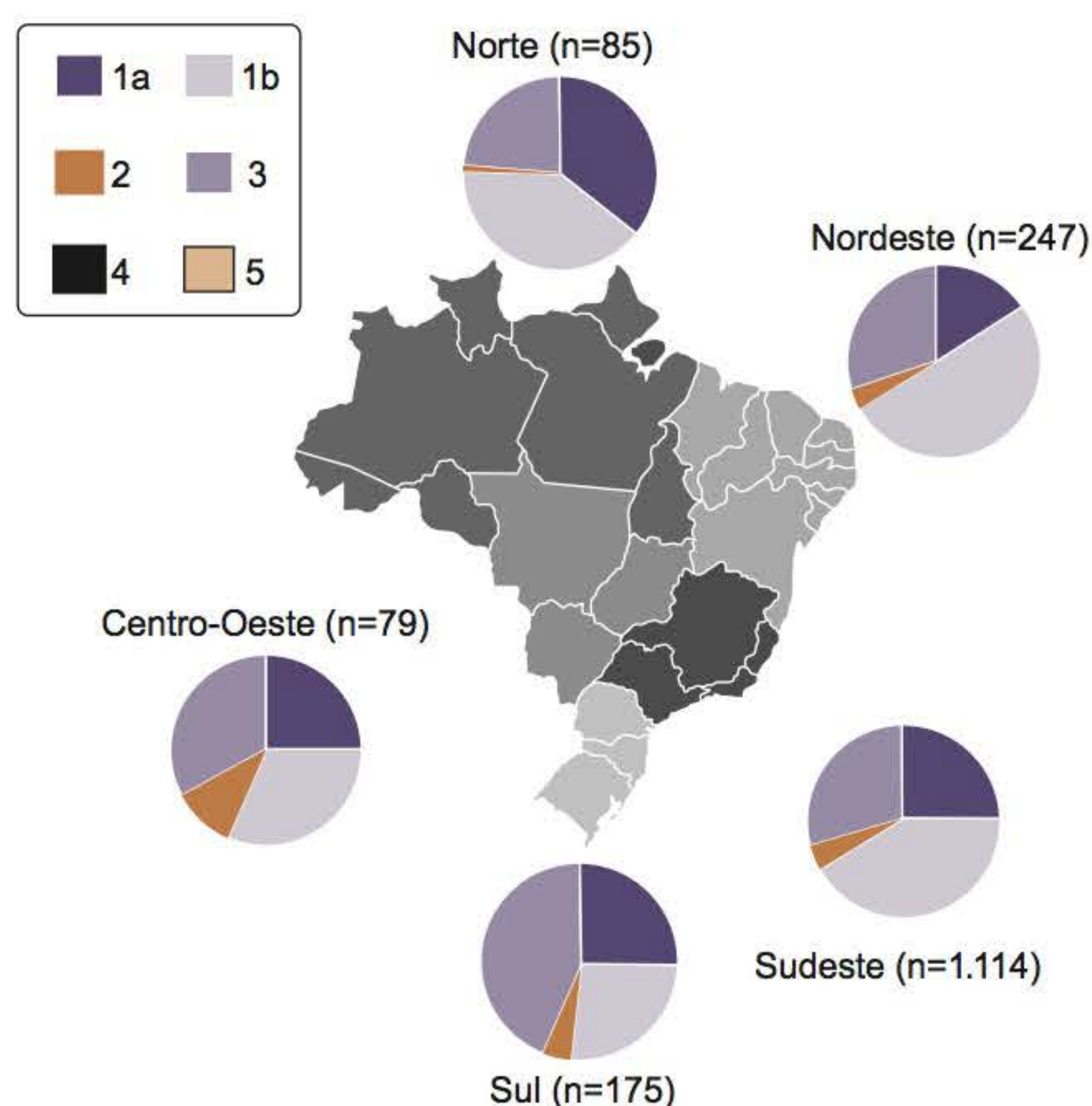
Na infecção crônica, o RNA viral atinge altos níveis plasmáticos<sup>57</sup> e normalmente é assintomática, apresentando-se de forma clínica moderada e silenciosa, que dificulta o controle da doença, facilitando a disseminação do vírus na comunidade, já que medidas preventivas não serão utilizadas. Dos indivíduos que evoluem para as formas crônicas, cerca de 20 a 30% desenvolvem quadro de cirrose hepática após um período de 20 anos de contágio, e cerca de 2 a 5% desenvolvem carcinoma hepatocelular (HCC).<sup>58</sup>

## ■ Epidemiologia

Estima-se que 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV e que a prevalência mundial seja de 3 a 5%.<sup>59</sup> Estudos epidemiológicos com doadores de sangue e pacientes com hepatite C revelaram que 75 a 85% dos indivíduos infectados não resolvem a infecção, tornando-se crônicos.<sup>55</sup> Segundo estimativa do Ministério da Saúde, entre 1 e 2 milhões de brasileiros estão cronicamente infectados pelo HCV e apenas 5.000 deles estão em tratamento.<sup>60</sup> Apesar da dificuldade de se estimar a prevalência da infecção pelo HCV, no Brasil observou-se um grande declínio a partir de 1989, quando alguns serviços de banco de sangue passaram a utilizar marcadores indiretos, entre os quais dosagem da ALT e pesquisa de anticorpos contra o HBcAg (anti-HBc). Esse procedimento diminuiu as hepatites em aproximadamente 50% e a queda foi intensificada com a introdução de testes específicos para anti-HCV na triagem de doadores de sangue, em 1991.<sup>48</sup> A partir de 1993, tanto a pesquisa da ALT quanto a de anti-HBc passaram a ser de realização obrigatória para a triagem de doadores de sangue, conforme as normas técnicas do Ministério da Saúde.<sup>61</sup> A soroprevalência do HCV é variável entre doadores de sangue no Brasil, de acordo com as regiões investigadas, sendo de 0,21% em São Paulo, na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP).<sup>62</sup> Na população geral de São Paulo, Focaccia *et al.* encontraram uma prevalência de anti-HCV de 1,4%, sendo a distribuição similar entre homens e mulheres.<sup>63</sup> Segundo dados do Ministério da Saúde, de 1994-2005 foram diagnosticados 52.489 casos e os dados obtidos nesses inquéritos sorológicos apontam para taxas de prevalência variando de 0,28 a 2,61%. Um estudo no Brasil sobre a distribuição dos genótipos entre pacientes com hepatite C crônica obteve uma frequência de 64,9% para o genótipo 1; 4,6% para o genótipo 2; 30,2% para o genótipo 3; 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5. O genótipo 1 foi o mais frequente em todas as regiões, sendo maior na Região Norte e menor na Região Sul do país. Já na Região Centro-Oeste prevalece o genótipo 2 e na Região Sul o genótipo 3.<sup>64</sup> (Figura 6.14)

## ■ Características e constituição genômica do HCV

O HCV é um membro da família Flaviviridae.<sup>65</sup> Nessa família, os vírus estão associados a zoonoses e doenças que acometem humanos. São classificados em pelo menos três diferentes gêneros: *Pestivirus* (vírus da diarreia bovina e da febre suína), *Flavivirus* (vírus da dengue e da febre amarela), que se relacionam com as mais importantes doenças transmitidas por artrópodes e, atualmente, o gênero



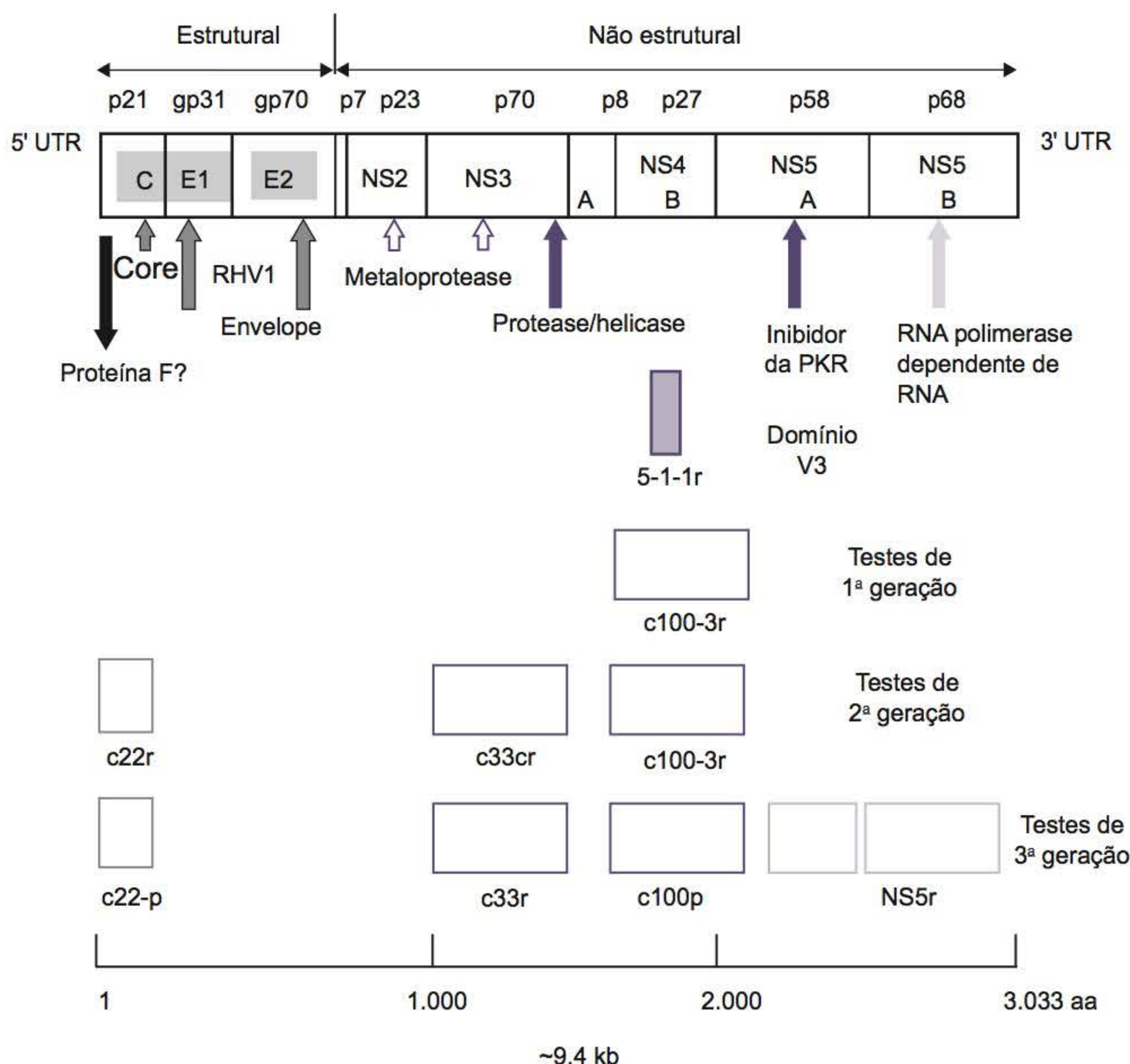
**Figura 6.14** Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões brasileiras.

*Hepacivirus*, cujo único membro é o HCV.<sup>66</sup> O HCV tem formato esférico, com 55 a 65 nm de diâmetro e envoltório lipídico de aproximadamente 7 nm de espessura. O genoma é constituído por uma fita simples de RNA, com polaridade positiva, contendo aproximadamente 9.400 nucleotídeos. A região codificante do genoma viral compõe-se de uma fase de leitura aberta (ORF) traduzida em uma poliproteína precursora de, aproximadamente, 3.000 aminoácidos (aa),<sup>3,67</sup> sendo também utilizada como molde para replicação do RNA viral. A partir do segmento N-terminal da poliproteína são processadas as proteínas estruturais do nucleocapsídeo (core), as proteínas do envelope viral (E1 e E2) e a proteína de canal iônico p7. As proteínas não estruturais (NS) são processadas a partir da porção C-terminal e são codificadas para proteases NS2, NS3, helicase (NS3), NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (RNA polimerase dependente de RNA).<sup>68</sup> O genoma viral está representado na Figura 6.15.

## Genótipos do HCV

Com base na sequência de nucleotídeos, o estudo dessa heterogeneidade resultou na classificação do HCV em seis genótipos principais. Eles são identificados com algarismos arábicos, de acordo com a ordem em que foram sendo descobertos e nomeados como “tipo”. Alguns tipos têm sequências estritamente relacionadas e são classificados como subtipos, identificados por letras minúsculas (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 3b etc.). Os diferentes genótipos são resultantes do acúmulo de mutações que ocorrem na evolução viral. Entre os diferentes genótipos a similaridade da região não estrutural do HCV é inferior a 68% e de 77 a 80% entre os diferentes subtipos de um mesmo genótipo.<sup>69</sup> A composição da quase espécie do HCV refere-se à variabilidade genética dentro do indivíduo infectado, como resultado de nova infecção com população viral heterogênea e acúmulo de mutações durante o curso da infecção.<sup>70</sup>





**Figura 6.15** Representação esquemática do genoma do HCV com as regiões não traduzidas (UTR), estruturais e não estruturais (NS) e as proteínas utilizadas como antígenos nos testes sorológicos. RHV1 = região hipervariável 1.<sup>21</sup>

## ■ Diagnóstico laboratorial da hepatite C

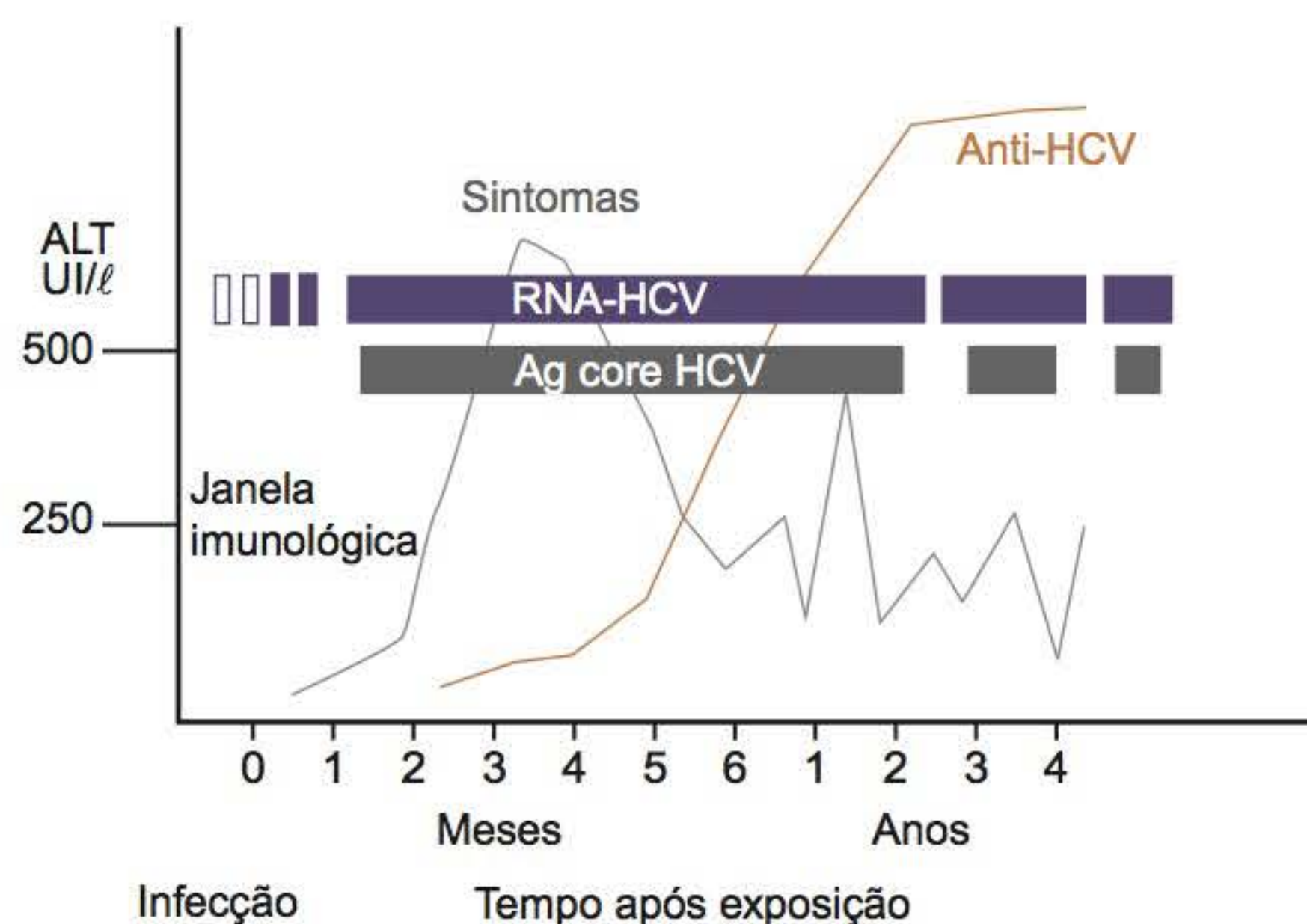
O diagnóstico da hepatite C é geralmente casual, já que a maioria dos indivíduos infectados apresenta a forma crônica e assintomática da doença. Assim, os testes de triagem sorológica e a detecção molecular do HCV são mais importantes na identificação desses recursos. Desde 1990, quando os testes de triagem para detecção de anticorpos contra o HCV foram licenciados e comercializados, surgiram várias versões de ensaios com o intuito de torná-los mais sensíveis e específicos. Apesar disso, os testes imunoenzimáticos utilizados para a triagem de anti-HCV apresentam sérias limitações pela alta frequência de resultados inespecíficos. Para a triagem sorológica em bancos de sangue, procura-se utilizar testes com elevada sensibilidade por causa da janela imunológica e, como consequência, pode resultar em uma parcela de resultados falso-positivos. O primeiro marcador a ser detectado no plasma de indivíduos após a infecção é o RNA viral, seguido do antígeno do core do HCV (HCVcAg). O pico da alanina aminotransferase (ALT) é observado em média 8 semanas após o início da infecção, época em que os anticorpos contra o antígeno do core tornam-se detectáveis. Os anticorpos específicos contra as proteínas virais aparecem cerca de 50 dias após o aparecimento do RNA viral (Figura 6.16).

Os anticorpos anti-HCV podem se tornar indetectáveis após a infecção ser controlada, definindo um fenômeno chamado de sororreversão. A sororreversão pode ser completa ou

parcial. A primeira é definida como a perda total de anticorpos específicos detectáveis, como por exemplo, mudança de resultado positivo para negativo no ELISA anti-HCV. A sororreversão parcial é caracterizada pelo desaparecimento ou diminuição de um ou vários, mas não de todos os anticorpos contra os antígenos do HCV. Essa sororreversão tem sido relatada em pacientes hemodialisados,<sup>72</sup> imunodeficientes<sup>73</sup> e indivíduos imunocompetentes depois de resposta completa à terapia com interferona- $\alpha$ .<sup>74</sup>

O *immunoblot* (IB) é um ensaio qualitativo utilizado para detectar anticorpos específicos para cada fração antígenoica do HCV separadamente no soro ou plasma, e foi desenvolvido para ajudar a resolver o problema dos resultados falso-positivos que poderiam ser gerados em um ELISA. Assim, os IB também foram desenvolvidos como de primeira (IB-1), segunda (IB-2) e de terceira (IB-3) geração, com os mesmos antígenos utilizados no ELISA das respectivas gerações. As novas versões do IB incluem também antígenos recombinantes e sintéticos provenientes das regiões mais conservadas do genoma viral de outros genótipos, entre os quais os tipos 2 e 3, além do 1. Esses antígenos, dispostos de modo linear ou em bandas sobre uma fita de nitrocelulose, são oriundos do core (4 epitopos), NS4 (3 epitopos), NS5 (3 epitopos) e E2/NS1.<sup>75</sup> Nos testes de terceira geração, a substituição de alguns antígenos recombinados por peptídeos sintéticos resultou em importante melhora na sensibilidade e na especificidade do teste, com uma redução de resultados indeterminados.





**Figura 6.16** Evolução dos marcadores da hepatite C.<sup>71</sup> RNA HCV = ácido ribonucleico do vírus da hepatite C; ALT = alanina aminotransferase; tarja branca = PCR negativo; tarja azul = PCR positivo.

Apesar da melhora dos antígenos utilizados, o IB anti-HCV apresenta, ainda, menor sensibilidade em relação aos testes de ELISA,<sup>76</sup> além de não apresentar especificidade ótima. Ambos os testes de triagem e suplementar podem ter resultados falso-positivos em hipergamaglobulinemias, hepatites autoimunes e falso-negativos em hipogamaglobulinemias, em condições de imunossupressão, entre outros.<sup>77</sup>

O diagnóstico molecular da infecção pelo HCV é fundamentado na detecção do RNA do HCV e na sua quantificação, por intermédio de técnicas de biologia molecular, padronizadas *in house* ou kits comerciais. Para detecção do RNA viral, a reação em cadeia da polimerase (PCR), qualitativa ou quantitativa, é a mais empregada e é considerada hoje a técnica mais adequada na caracterização do estado de infecção pelo HCV, possibilitando a determinação da viremia muito precocemente, ainda na fase de janela imunológica, e também no acompanhamento da terapêutica pela quantificação da carga viral.

► **Testes de triagem.** Anticorpos na infecção pelo HCV não significam proteção, imunidade ou defesa efetiva, como ocorre em outras doenças virais, embora a presença dos anticorpos seja a base do diagnóstico no acompanhamento laboratorial e a detecção deles constitua a maneira mais prática de triagem.<sup>78</sup> O ensaio imunoenzimático mais empregado utiliza antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos e tem a vantagem de ser prático, com possibilidade de automação e custo relativamente baixo. Os resultados positivos ou inconclusivos nesses testes devem ser confirmados por *immunoblots*, que, fornecem a positividade individual para cada antígeno utilizado nas tiras de suporte sólido e conferem maior especificidade à reação. Entretanto, recentemente as técnicas moleculares têm sido preferidas como teste suplementar, resultando em um novo algoritmo cuja confirmação é feita por testes como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR).

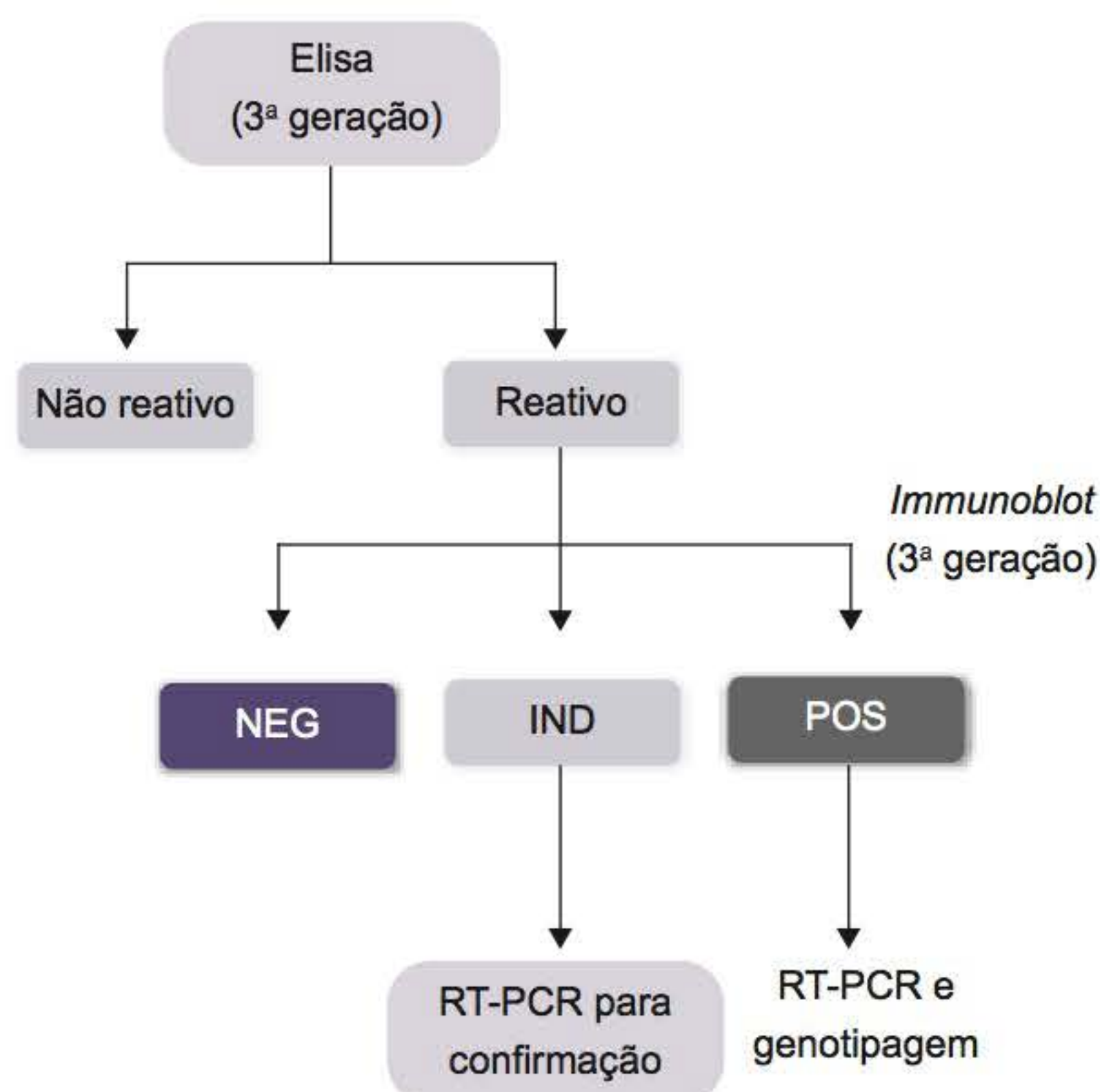
► **Kits diagnósticos comerciais.** O primeiro teste ELISA (ELISA-1 ou de primeira geração), desenvolvido em 1990, tinha como antígeno somente uma proteína recombinante derivada, por clonagem, do gene NS4 (C100-3). Esse teste, por utilizar um único antígeno, demonstrou baixa sensibilidade, em torno de 70 a 80%, em regiões de alta prevalência para o HCV, e baixa especificidade, principalmente em população de baixo risco, em que se observou um valor preditivo

positivo de 30 a 50%. Alguns autores têm relatado a ocorrência de até 70% de resultados falso-positivos em amostras de doadores de sangue.<sup>79</sup> Uma das causas da inespecificidade decorre das reações cruzadas com superóxido dismutase (SOD), empregada no processo de clonagem da proteína. Com a baixa sensibilidade dos testes de primeira geração e a soroconversão tardia, de cerca de 2 a 4 meses após a infecção em pacientes imunocompetentes e de 6 a 12 meses em pacientes imunodeficientes, a ocorrência de transmissão do HCV pelo sangue ainda se manteve alta.<sup>68</sup> Em 1992 surgiu o ensaio de segunda geração (ELISA-2) que utilizou as proteínas C22-3r da região do core, C33cr da região NS3 e C200 das regiões NS3 e NS4 do genoma viral. A sensibilidade e a especificidade aumentaram, com redução da janela sorológica para 88 dias.<sup>80</sup> Posteriormente, em 1994, foi desenvolvido o teste de terceira geração (ELISA-3), que acrescentou ao teste anterior a proteína NS5 e também a utilização da proteína do NS3 reconfigurada, ou seja, quimicamente modificada para aumento da reatividade e, conseqüentemente, para aumentar a sua sensibilidade. Além disso, em vários deles, algumas frações antigênicas foram substituídas, tais como a c100-3r e a c33cr por peptídeos sintéticos (Figura 6.15) correspondentes aos seus epitopos imunodominantes, melhorando também sua especificidade. Entretanto, os testes de terceira geração não apresentaram diferenças significativas na sensibilidade em relação aos de segunda geração, mas houve discreta diminuição da janela sorológica para aproximadamente 66 dias.<sup>80</sup> Outros testes com o objetivo de diminuir a janela imunológica estão disponíveis comercialmente. Um deles é capaz de detectar o antígeno do core do HCV (HCVcAg) em cerca de 3 a 5 dias após o surgimento do RNA viral e o outro é um ensaio combinado para detecção simultânea do antígeno do core e de anticorpos anti-HCV em plasma ou soro humano.

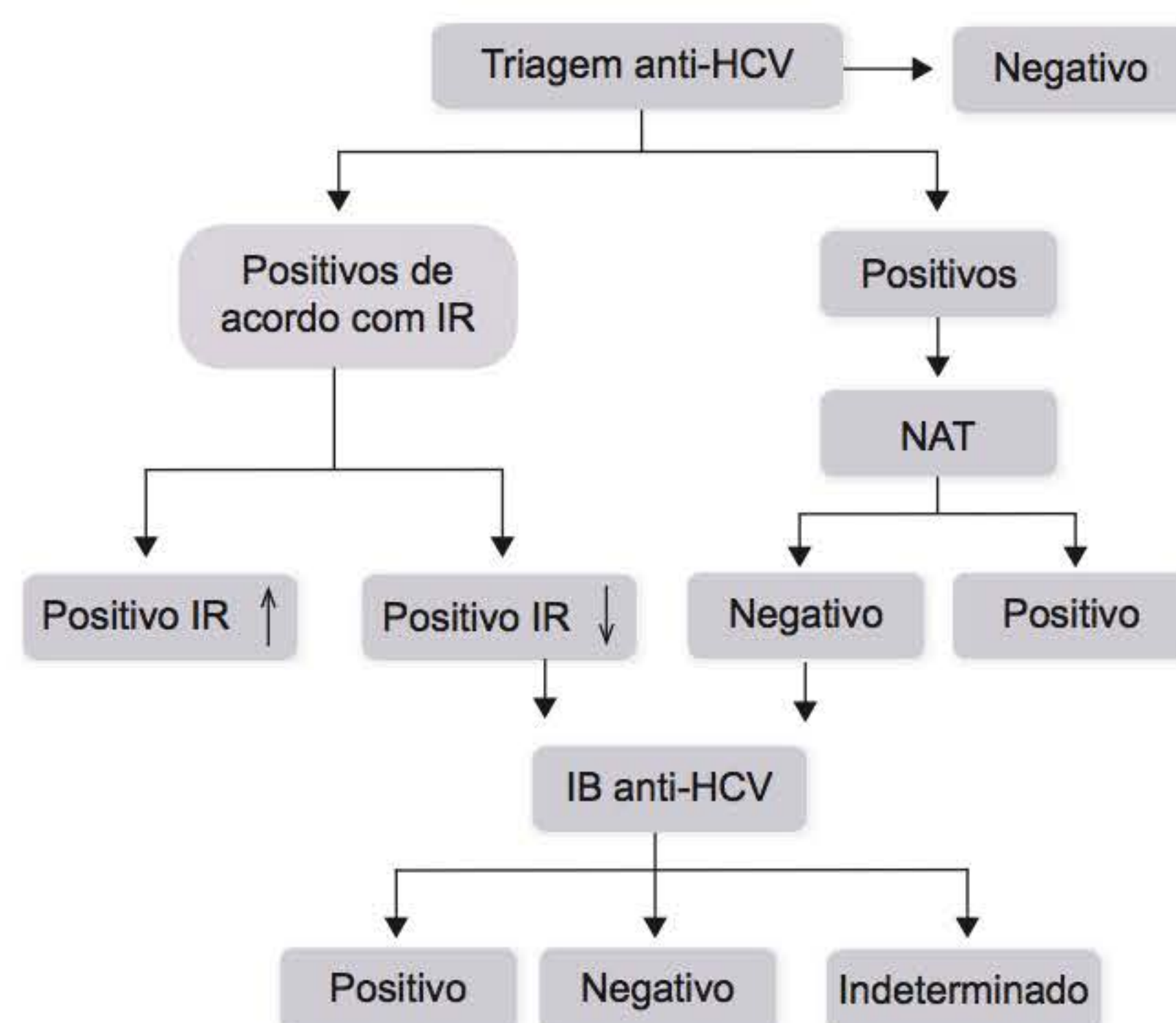
Os testes reativos no ELISA podem ser confirmados pela PCR ou pelo IB. Devido à facilidade de padronização e de automação dos testes de ELISA HCVcAg, esta pode ser uma alternativa eficiente em países que, por motivos econômicos, não possam utilizar a técnica de testes de ácidos nucleicos (NAT) para o HCV na triagem da infecção, principalmente durante a fase de janela imunológica.<sup>81</sup>

Em 2003, os CDC propuseram dois novos algoritmos para detecção do HCV, sendo um deles o uso de um índice de reatividade estabelecido pela razão da densidade óptica (DO) da amostra e o valor de corte do teste (*cut-off* ou CO).<sup>82</sup> O valor desse índice (DO/CO) deve ter correlação com a positividade no *immunoblot* de no mínimo 95%, para que o resultado possa ser considerado como positivo. A DO/CO deve ser estabelecida para cada laboratório dentro de suas condições de rotina e os resultados maiores que os valores desse índice seriam considerados positivos, e abaixo dele teriam de ser confirmados pelo *immunoblot*. O segundo algoritmo consiste na utilização de um teste molecular (PCR) nas amostras com teste de triagem positivo ou inconclusivo. Nas amostras cujos resultados da PCR forem negativos, o *immunoblot* deverá ser realizado. O algoritmo utilizado até então é a realização do *immunoblot* nas amostras reativas pelo teste de triagem (Figura 6.17). A vantagem dos algoritmos alternativos é de serem mais econômicos ou fornecerem um diagnóstico mais completo, informando também sobre a presença ou não da viremia (Figura 6.18).<sup>82</sup> Assim, a escolha de um ou outro algoritmo depende do objetivo da realização do diagnóstico, como mostra o trabalho de Barreto *et al.*<sup>83</sup> O Quadro 6.2 mostra a interpretação provável dos resultados obtidos usando esses algoritmos.





**Figura 6.17** Algoritmo do diagnóstico confirmatório da hepatite C utilizando *immunoblot* para detecção de anticorpos anti-HCV.<sup>82</sup>



**Figura 6.18** Algoritmo alternativo do diagnóstico da hepatite C utilizando o índice de reatividade como *cut-off*.<sup>82</sup>

**Quadro 6.2 - Recomendações para liberar os resultados dos testes para detecção de anticorpos anti-HCV e a necessidade de realização de testes confirmatórios.**<sup>82</sup>

Resultados do teste de triagem anti-HCV	Resultados do teste confirmatório	Interpretação	Comentários
Negativo	Não realizar	Anti-HCV negativo	Não infectado pelo HCV Infecção recente Outra evidência indicativa de infecção pelo HCV
Positivo com valor alto de DO/CO	Não realizar	Anti-HCV positivo	Provável infecção presente ou passada, não realizar teste suplementar com DO/CO alto. Menos de 5% de falso-positivos, realizar teste suplementar se necessário
Positivo	IB positivo	Anti-HCV positivo	Indica infecção presente ou passada
Positivo	IB negativo	Anti-HCV negativo	Não infectado pelo HCV Infecção recente Outra evidência indicativa de infecção pelo HCV
Positivo	IB indeterminado	Anti-HCV indeterminado	Resultado não definido Coletar nova amostra depois de 1 mês: repetir anti-HCV ou realizar teste RNA HCV
Positivo	Teste de ácido nucleico (NAT) positivo	Anti-HCV positivo RNA HCV positivo	Infecção ativa pelo HCV
Positivo	NAT negativo IB positivo	Anti-HCV positivo RNA HCV negativo	Anti-HCV positivo indica infecção presente ou passada Um único teste de HCV RNA negativo não exclui infecção ativa

DO = densidade óptica; CO = densidade óptica corte do teste; IB = *immunoblot*.

## ■ Genotipagem do HCV

A PCR permite ainda que se realize a genotipagem do HCV que avalia a possibilidade de coinfeções ou ainda de reinfecções por cepas virais diferentes. Pode-se caracterizar o genoma viral classificando-o em diferentes genótipos e subtipos do HCV pelas técnicas de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), de sequenciamento genômico e o método comercial LiPA® (Line Probe Assay – Innogenetics, Bélgica),<sup>84</sup> fundamentado na hibridação dos produtos amplificados da região 5' UTR com sondas genótipo-específicas.<sup>85</sup> Os métodos baseados na região 5' UTR do VHC permitem que se faça a genotipagem do HCV para a maior parte dos genótipos circulantes, mas

recentemente foi demonstrado que esses métodos podem não identificar propriamente o genótipo 6, que não é encontrado em nosso país, sendo praticamente restrito ao Sudeste Asiático. Além disso, a classificação dos subgenótipos do HCV, identificados por uma letra minúscula após o genótipo (p. ex., 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b etc.), pode apresentar resultados equivocados com essa metodologia. Como para efeitos clínicos a classificação do HCV em genótipos é suficiente, em nosso país ainda são utilizadas metodologias baseadas apenas na região 5' UTR, mas novas metodologias de LiPA, que analisam também a região C ou de sequenciamento da região NS5B, foram desenvolvidas para melhorar a classificação dos subgenótipos virais, evitando possíveis erros na classificação dos genótipos virais.



## ▪ Tratamento

Atualmente o tratamento para hepatite crônica C fundamenta-se na combinação de interferona- $\alpha$  peguilada (IFN- $\alpha$ -Peg), IFN- $\alpha$ 2a peguilada ou IFN- $\alpha$ 2b peguilada e ribavirina, sendo que o tratamento de referência emprega doses semanais de IFN- $\alpha$  peguilada e doses diárias de ribavirina. As técnicas moleculares são úteis no seguimento de todas as fases do tratamento.<sup>84</sup> A quantificação dos níveis de RNA viral é um dos parâmetros utilizados para verificar a resposta virológica sustentada (clareamento do RNA do HCV por 24 semanas depois da suspensão do tratamento), a qual é o ponto final da terapia.<sup>86</sup>

Diversos fatores do hospedeiro podem influenciar o resultado do tratamento, tais como a cinética da redução da carga viral com a terapia com IFN, as quase espécies virais e as mutações na região NS5A. Foi observado que pacientes infectados pelo genótipo 1 apresentam pior resposta ao tratamento com interferona do que aqueles infectados com genótipos 2 e 3.<sup>87</sup> Estudos matemáticos mostraram que a resposta viral precoce, definida como a diminuição de 2 log na carga viral nas primeiras 12 a 24 h de tratamento, é preditiva de resposta virológica sustentada (RVS) e pode ser usada para monitorar o tratamento.<sup>87</sup> Essas considerações permitem afirmar que o tipo do genótipo e a carga viral pré-tratamento são os mais preditivos na resposta terapêutica.<sup>58</sup>

No Brasil, por meio da Portaria nº 863, de 4 de novembro de 2002, da Secretaria de Assistência à Saúde, foi estabelecido um protocolo clínico com diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite crônica pelo vírus C. Esse protocolo determina critérios de inclusão/exclusão de pacientes no tratamento, critérios de diagnóstico, esquema terapêutico, mecanismos de acompanhamento e avaliação desse tratamento.<sup>60</sup>

## ▪ Perspectivas de produção de vacinas

Apesar do conhecimento sobre o HCV, por mais de uma década não houve grandes avanços no desenvolvimento de uma vacina.<sup>88</sup> Os maiores obstáculos são a falta de um sistema de cultura adequada para a propagação do vírus e de um modelo animal de pequeno porte. Estudo recente em animais de pequeno porte demonstrou que a filogenia do *Tupaia belangeri* está estritamente relacionada com a dos primatas e esta espécie pode ser infectada pelo HCV *in vivo*.<sup>89</sup> Os hepatócitos do *Tupaia belangeri* podem representar um novo modelo de cultura celular para o estudo das importantes etapas do ciclo de vida viral, incluindo a avaliação funcional do CD81 como receptor celular do HCV, a existência de outros receptores e também a neutralização viral.<sup>90</sup>

Outro obstáculo para a vacina é a alta heterogeneidade do vírus, fazendo supor que deveria ser desenvolvida uma vacina para cada genótipo, e também porque a resposta de anticorpos aos antígenos recombinantes é pobre em humanos. Um fato ainda mais relevante é que a imunidade ao HCV não é completa. Após a recuperação da infecção é possível a reinfecção como resultado da exposição a cepas diferentes do vírus ou às mesmas cepas. Esses fatos mostram que o desenvolvimento de uma vacina requer um avanço fundamental na imunologia. No presente momento, o controle da hepatite C requer medidas de saúde pública e disponibilidade de tratamento a todos os indivíduos infectados que apresentem indicação para tal.<sup>91</sup>

## ► Hepatite delta

Em 1977, Rizzetto *et al.*<sup>92</sup> observaram no núcleo de hepatócitos de pacientes com hepatite B crônica um antígeno desconhecido, semelhante ao antígeno do core (HBcAg). Embora não coexistisse com ele, foi associado à infecção pelo HBV. Esse antígeno foi chamado de delta e pacientes que o acometiam desenvolviam anticorpos antidelta. Somente em 1980 o antígeno delta (HDVAg) foi reconhecido como componente de um novo vírus, um agente-satélite e subviral humano, que depende da presença do HBV para sua replicação e de seu respectivo envelope de proteínas, o HBsAg, para completar seu ciclo biológico.

## ▪ Características e constituição genômica do vírus da hepatite delta

A partícula viral do vírus da hepatite delta (HDV) é esférica, envelopada, medindo aproximadamente 36 nm. O seu genoma não está relacionado com o do hepadnavírus, do qual o HBV faz parte, e é constituído de uma cadeia simples de RNA negativa, circular, de aproximadamente 1,7 kb de comprimento, contendo cerca de 60% de C + G.<sup>93</sup> A cadeia circular de polaridade positiva contém somente uma fase de leitura aberta (ORF) que codifica o HDVAg, única proteína conhecida, por meio de transcrição de 0,8 kb de RNA mensageiro.<sup>94,95</sup> O HDVAg é constituído de duas proteínas, uma curta (*short*) denominada HDVAg-S (195 aminoácidos), requerida para a replicação viral, e outra longa (*long*) chamada de HDVAg-L (214 aminoácidos), que inibe a replicação viral e promove o empacotamento do RNA nos vírions. Esse antígeno localiza-se no núcleo das células hepáticas. A exata medida do genoma mostrou que o HDV não é um vírus convencional e é bem menor que o DNA de outros vírus conhecidos, que acometem animais, com dimensão similar ao tamanho e estrutura dos virioides de plantas superiores.

O HDV tem sua replicação defectiva, é um vírus RNA-dependente, que requer o HBsAg do HBV para encapsular seu próprio genoma. As proteínas da membrana externa do HDV são providas pelo HBV.<sup>93</sup> O HBsAg do invólucro do HDV constitui-se de três tipos de proteína. A primeira é codificada pelo gene S do DNA do HBV; a segunda inclui a sequência de 55 aminoácidos da região Pré-S2; e a terceira inclui também os 108 a 119 aminoácidos da região pré-S1. O revestimento externo do HDV pelo HBsAg impede a hidrólise interna do RNA do HDV<sup>92</sup> (Figura 6.19).

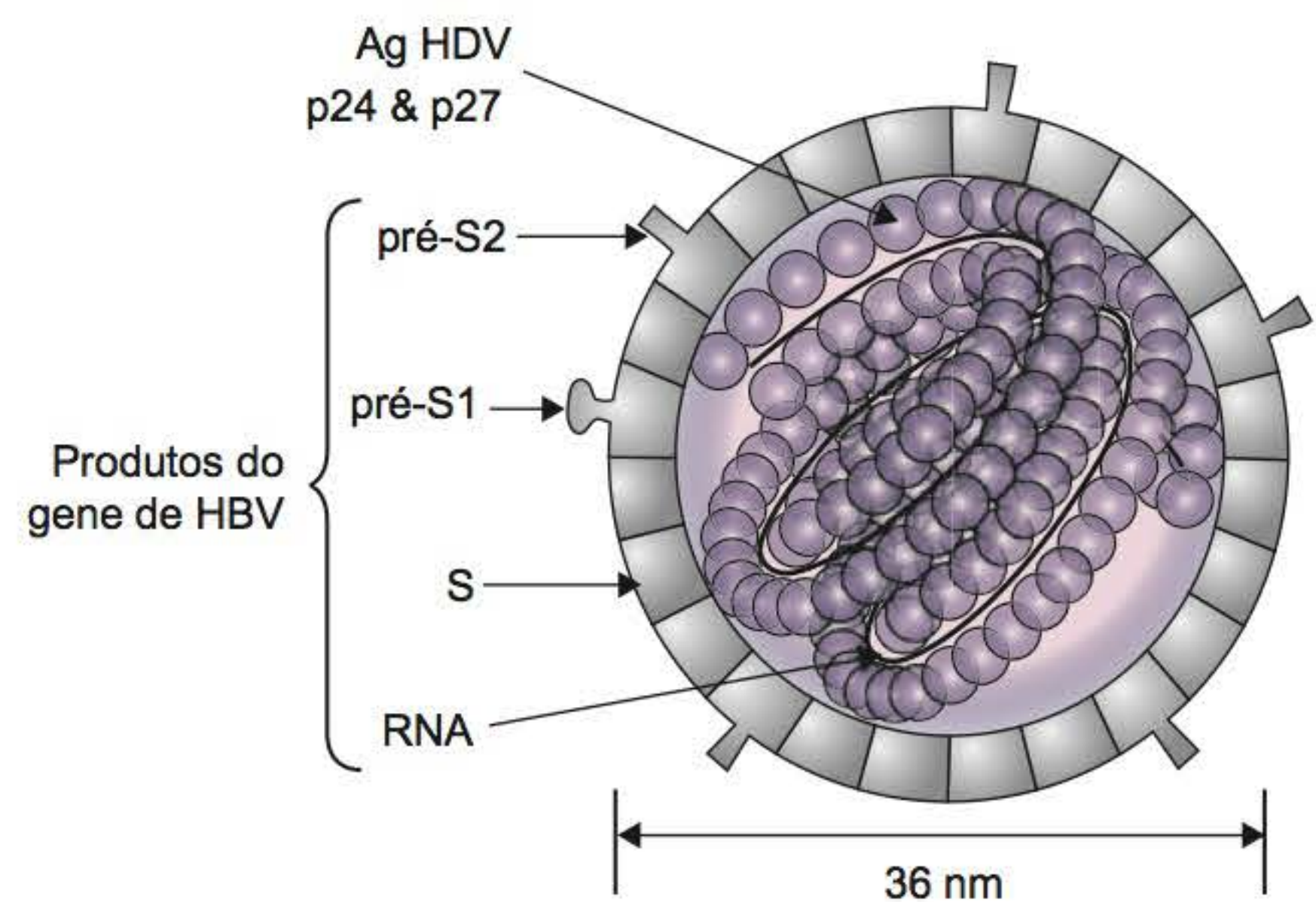


Figura 6.19 Representação esquemática do HDV.



## ▪ Transmissão

O HDV é transmitido por via parenteral, de modo similar ao HBV. A transmissão pelo contato sexual pode ocorrer e a vertical (da mãe para o recém-nascido) é rara. A transmissão intrafamiliar também é importante.<sup>96</sup> Um fator epidemiológico para a disseminação do HDV é o estado de portador crônico do HBV em áreas endêmicas, dependentes de drogas ilícitas, hemodialisados e politransfundidos.<sup>92,97</sup>

A infecção pelo HDV pode causar doença hepática grave, tanto aguda como crônica, com taxa de cronicidade de 70 a 90% nos casos de superinfecção, levando a cirrose em 30 a 70% dos pacientes.<sup>98</sup> Estima-se que 15 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HDV e que 5% dos portadores do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) estejam coinfectados com o HDV.<sup>99</sup>

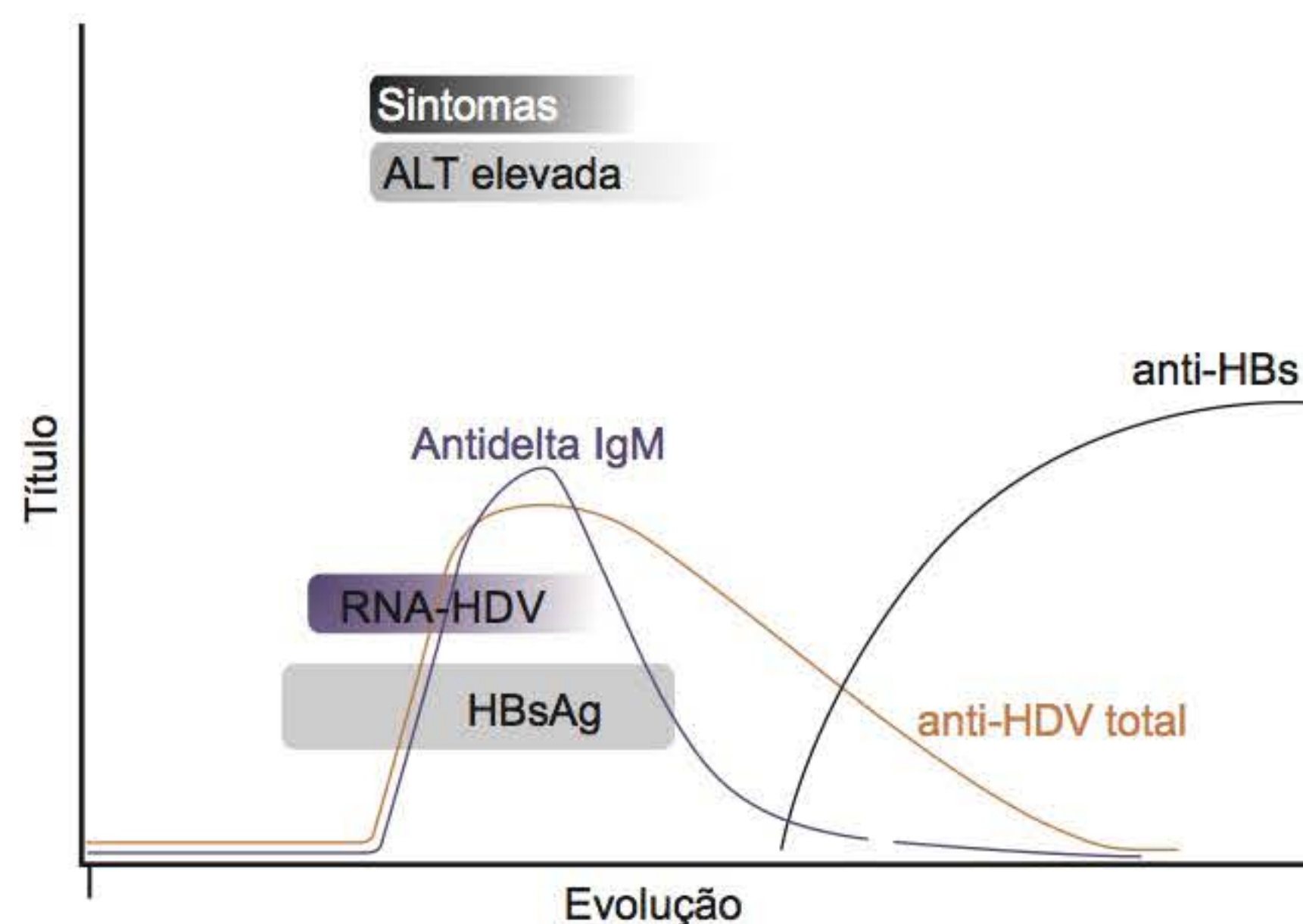
Um fator que pode influenciar o curso da doença é o genótipo do HDV. Esse vírus está dividido em oito principais genótipos que diferem entre si em 40% na sequência de nucleotídeos.<sup>100</sup> Enquanto o genótipo do HBV parece não afetar a interação do HBsAg com o HDV, o genótipo do HDV pode influenciar a montagem do vírion com o HBsAg. O genótipo 1 é o mais frequente no mundo e sua patogenicidade é variável. Um estudo em Taiwan mostrou que pacientes infectados com genótipo tipo 1 do HDV tiveram menor taxa de remissão e mais resultados adversos do que o genótipo tipo 2 do HDV. Os genótipos 2 e 4, encontrados na Ásia Oriental, foram associados a doença mais branda, no entanto a variante 2b foi associada a maior progressão para cirrose; o genótipo 3 do HDV foi associado a hepatite fulminante na América do Sul.<sup>100</sup>

Variações na sequência de aminoácidos expressas no HBsAg ocorrem naturalmente e podem diminuir a eficiência na formação dos genótipos 2 e 4, mas não no genótipo 1,<sup>101</sup> levando provavelmente a sua ampla distribuição no mundo. A infecção delta crônica é a principal causa de cirrose hepática em crianças e adultos jovens em áreas endêmicas da Itália, da Inglaterra e na região Amazônica do Brasil. Em áreas de alta endemicidade pelo HBV, os portadores crônicos são reservatórios importantes na disseminação do vírus delta.<sup>13</sup>

## ▪ Patogênese da hepatite D

Estudos experimentais e clínicos apontam para o caráter patogênico do HDV. Na fase aguda, o RNA do HDV ou o HDVAg podem ter um efeito citotóxico nos hepatócitos. Já quando é expresso em grande quantidade o pequeno HDVAg é diretamente citotóxico para as células.<sup>99</sup> Na fase crônica, a inflamação em torno dos hepatócitos infectados e de vários anticorpos sugere um modelo de resposta imune na patogênese do HDV. O anticorpo mais prevalente implicado nesse aspecto é o anticorpo microssomal fígado-rim tipo 3 (LKM3) dirigido contra a uridina difosfato glucuronil transferase.<sup>102</sup>

A interação entre os dois vírus é complexa e o HDV pode reprimir o aparecimento dos marcadores da hepatite B nas células infectadas e até mesmo levar à eliminação da replicação viral ativa. A infecção pelo HDV pode ser adquirida de dois modos diferentes: coinfeção e superinfecção. A *coinfeção* é simultânea pelos dois vírus (HBV e HDV) e resulta em infecção aguda, muitas vezes autolimitada. O período de incubação depende da concentração do inóculo e, dependendo do título relativo do HBV ou HDV, um ou dois acessos de hepatite podem ser vistos.<sup>93</sup> A possibilidade de um indivíduo evoluir para doença crônica na coinfeção é similar a quando está infectado somente pelo HBV.<sup>103</sup> O curso sorológico da coinfeção HBV e HDV está esquematizado na Figura 6.20.



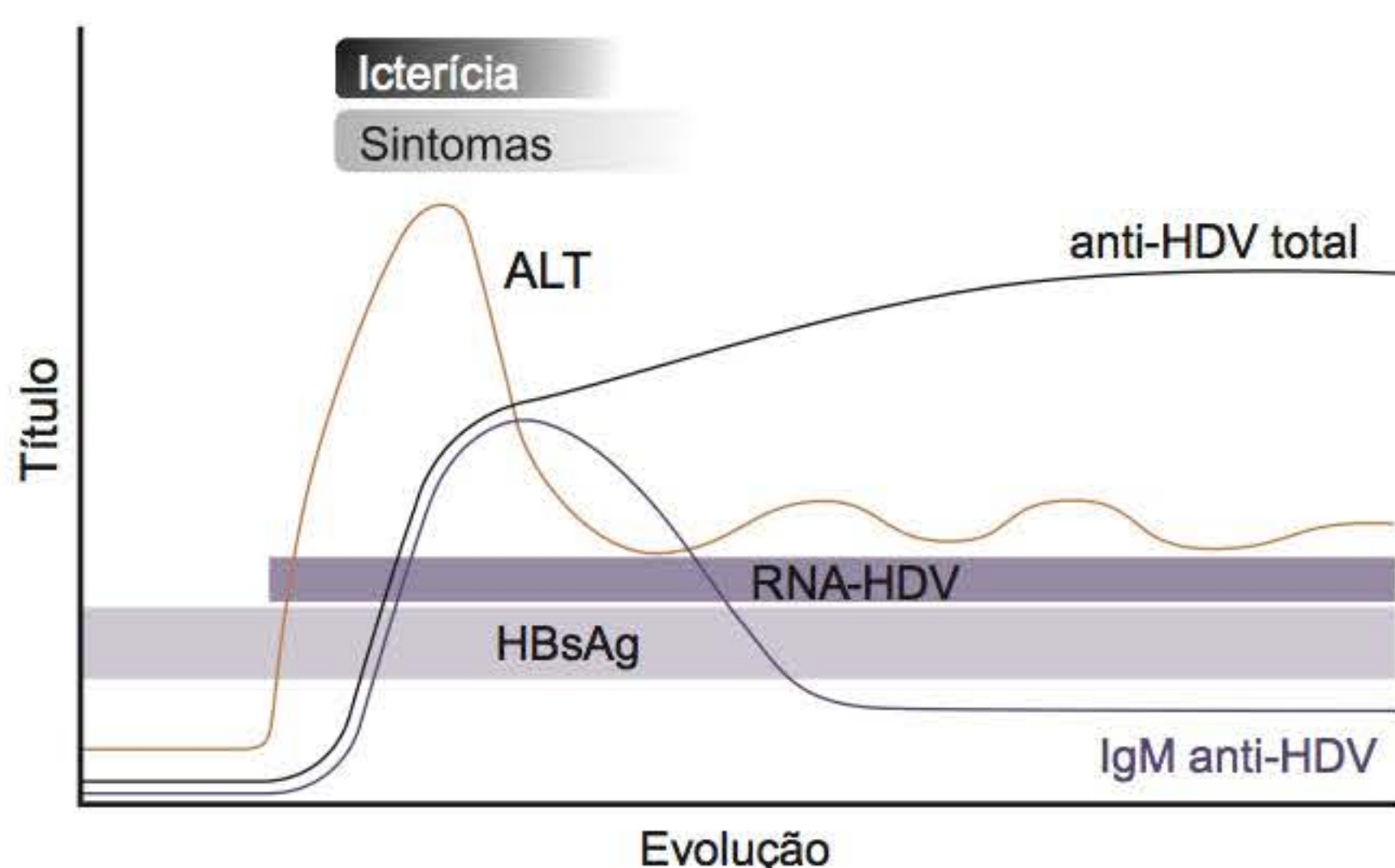
**Figura 6.20** Curso sorológico característico da coinfeção pelo HBV e pelo HDV.

A *superinfecção* ocorre quando um portador do HBV crônico adquire o HDV, ocasionando uma hepatite aguda, grave, com um período de incubação curto que induz à hepatite D crônica em mais de 80% dos casos. A hepatite crônica grave frequentemente progride para cirrose. Durante a fase aguda da infecção pelo HDV a síntese de HBsAg e DNA do HBV é inibida até o clareamento do HDV.<sup>93</sup> O curso sorológico da superinfecção HBV e HDV está esquematizado na Figura 6.21.

## ▪ Diagnóstico laboratorial da hepatite D

Os testes sorológicos são úteis para distinguir essas duas formas de infecção do HDV e estão disponíveis comercialmente. O diagnóstico pode ser feito pela detecção dos anticorpos IgM e IgG contra o HDVAg no soro. Na coinfeção (HBV + HDV) a fase aguda é determinada pela presença do anti-HBc IgM sem a expressão da antigenemia D.<sup>104</sup> Os marcadores sorológicos do HDV surgem após 4 a 8 semanas da infecção, com o aparecimento inicial do RNA-HDV, seguidos do HDVAg e, posteriormente, do anti-HDV IgM e anti-HDV total (Quadro 6.1).

Na superinfecção (portador do HBV e infecção aguda pelo HDV), a pesquisa do anti-HBc IgM é negativa, HBeAg e/ou anti-HBe são positivos, dependendo do estado do portador, e anti-HDV IgM e anti-HDV total são positivos (Quadro 6.3).



**Figura 6.21** Curso sorológico característico da superinfecção pelo HBV e pelo HDV.



**Quadro 6.3 • Investigação laboratorial da hepatite delta.<sup>13</sup>**

Testes	Interpretação
HBsAg (+) anti-HBc total (+) e anti-HDV total (+) anti-HBc IgM (+) anti-HDV IgM (+)	Coinfecção: HBV + HDV (Encaminhar para serviço especializado)
HBsAg (+) anti-HBc total (+) e anti-HDV (-) ou (+) anti-HBc IgM (-) anti-delta IgM (+)	Superinfecção: HBV crônico + HDV (Encaminhar para serviço especializado)
HBsAg (-) anti-HBc total (-)	Suscetível à infecção pelo HBV e HDV (Avaliar vacinação para HBV)

Nos tipos crônicos de hepatite D, o diagnóstico sorológico baseia-se na pesquisa do anticorpo IgM anti-HDV ou total e a confirmação da presença do Ag-HD no tecido hepático.<sup>104</sup>

Técnicas moleculares como a PCR e hibridização podem ser utilizadas para a pesquisa do RNA do HDV no soro ou no tecido hepático, e sua presença indica alta infectividade e sua persistência, progressão para cronicidade. O RNA do HDV é detectável em 90% dos pacientes na fase sintomática e torna-se indetectável depois da recuperação clínica.<sup>105</sup> Durante o seguimento o desaparecimento do anticorpo IgM anti-HDV indica recuperação da infecção crônica do HDV. Pesquisa de anticorpos anti-HDV deve ser realizada em pacientes com HBsAg positivos e hepatite crônica ativa. Muitos pacientes com HDV crônico têm anticorpos anti-HBeAg e níveis reduzidos de replicação. O RNA do HDV pode ser detectado em 60 a 75% dos pacientes e normalmente está correlacionado com níveis elevados de ALT e danos hepáticos.<sup>103</sup>

## ▪ Tratamento

A infecção relacionada com o HDV é difícil de ser tratada. Se uma hepatite fulminante ocorrer na fase aguda da hepatite D o transplante de fígado é a única opção de tratamento.<sup>106</sup> No momento o tratamento é feito com IFN- $\alpha$  durante 1 ano em portadores do HDV. Melhores resultados são obtidos com IFN-Peg, que proporciona um clareamento viral sustentado do RNA-HDV no soro.<sup>107</sup>

O problema da terapia no HDV é que o vírus não tem nenhum alvo com função enzimática específica, tais como as polimerases e as proteases do HBV e do HCV. A atividade do HDV depende do HBsAg e não da replicação do HBV e de seu nível de RNA.<sup>100</sup>

Nos países em que ocorre o controle da infecção pelo HBV, houve diminuição na circulação do HDV, mudando o cenário clínico da infecção.<sup>108</sup> Já nos países subdesenvolvidos, onde não há controle do HBV, a HDV continua sendo um grande problema de saúde pública.

## ► Vírus da hepatite E

No período entre 1955 e 1956 ocorreu um surto de hepatite em Deli, na Índia, que envolveu aproximadamente 29 mil indivíduos após a ingestão de água potável contaminada com esgoto. Pela abrangência da infecção ela foi considerada uma epidemia que motivou amplos estudos, levando ao conhecimento de um agente etiológico distinto dos demais até então conhecidos.<sup>109</sup> A primeira evidência desse outro agente que causava hepatite transmitida pela água foi observada em 1983 e ficou conhecido como o agente etiológico da hepatite não A não B de transmissão entérica (ET-HNANB). Subsequentemente foi associado

à principal causa de hepatite esporádica em regiões nas quais o tipo epidêmico existia. O agente viral para ET-HNANB foi clonado, sequenciado e designado como vírus da hepatite E (HEV).<sup>110,111</sup> Em menos de duas décadas, desde que foi identificado, seu clone infeccioso de DNA complementar (cDNA) foi conhecido<sup>112</sup> e muito tem sido feito para o diagnóstico da hepatite E e a produção de uma vacina.

## ▪ Características e constituição genômica do HEV

O HEV foi identificado pela primeira vez nas fezes de pacientes com ET-HNANB por meio da microscopia eletrônica<sup>113</sup> e, pelas suas características, foi inicialmente classificado na família Caliciviridae dos agentes do grupo dos vírus Norwalk (*Norwalk virus*). Entretanto, após a análise genômica mais detalhada verificou-se que o HEV é um vírus filogeneticamente distante dos outros agentes da família Caliciviridae.<sup>114</sup> O HEV foi classificado como uma espécie do novo gênero *Herpesvirus* na família Herpesviridae;<sup>115</sup> contudo, novas informações sobre sua expressão, estratégia de replicação e dos padrões de processamento de seus componentes são necessárias para uma classificação conclusiva.

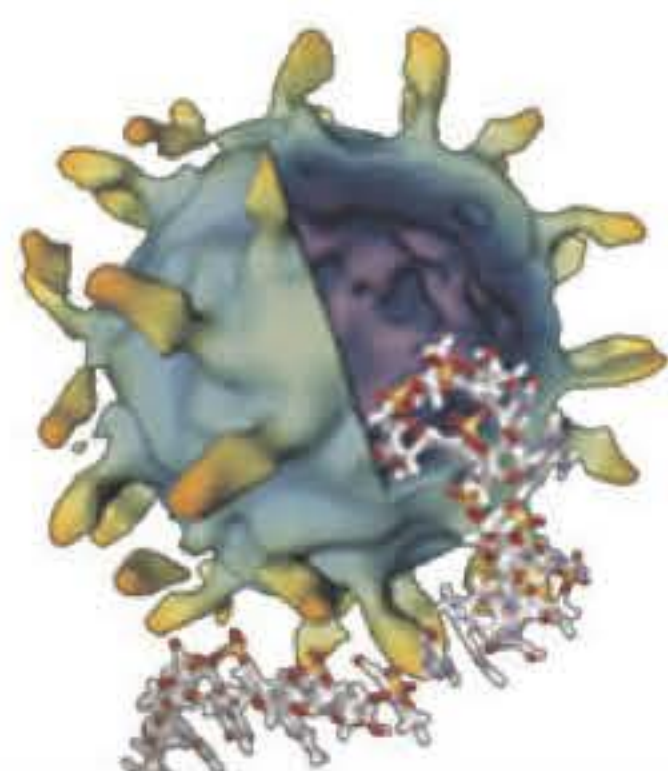
A partícula viral é pequena, esférica, não envelopada, medindo de 27 a 34 nm de diâmetro.<sup>113</sup> O genoma de aproximadamente 7,2 kb de comprimento consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva, poliadenilado.<sup>116</sup> Contém duas curtas regiões não traduzidas (UTR), 5' e 3' UTR. Os genes não estruturais estão localizados na região 5' e os genes estruturais na região 3'.<sup>117</sup>

Com base na análise molecular de isolados distintos geograficamente, o genoma pode conter três fases de leitura abertas (ORF) sobrepostas.<sup>118</sup> A ORF1 está localizada no final da região 5', começa no nucleotídeo (nt) 28 e contém 5.079 pares de base (pb) (1.693 aminoácidos) de comprimento. É a maior das três e codifica uma poliproteína não estrutural. A análise das sequências dos nucleotídeos de cepas birmanesas isoladas revelou a presença de sequências consensuais na ORF1, da metiltransferase, da cisteína protease semelhante à papaína, da RNA helicase e da RNA polimerase dependente de RNA,<sup>117</sup> envolvidas na replicação viral; ORF2 está localizada na região 3', começa no nucleotídeo 5147, contém 1.980 pb e codifica as principais proteínas estruturais do capsídio; compreende também uma proteína glicosilada utilizada nos transportes,<sup>119</sup> os principais epitopos imunológicos e um polipeptídeo com um alto percentual de aminoácidos básicos; ORF3 é a menor delas, está localizada no final da ORF1, engloba 369 pb, sobre põe a ORF1 no 5' final por 1 nt, sobre põe-se significativamente a ORF2<sup>120</sup> e codifica uma pequena fosfoproteína imunogênica associada ao citoesqueleto.<sup>121</sup> A região 5' não traduzida (28 pb) possivelmente desempenha um papel na transcrição e expressão do vírus. O coeficiente de sedimentação encontrado para o HEV foi de 183S e algumas vezes em partículas defectivas de 165S. O HEV é resistente a mudanças de pH entre ligeiramente alcalino e ácido, mas parece não tolerar altas concentrações de sais.

A estrutura tridimensional de uma automontagem da partícula recombinante do HEV foi feita a 22 Å de resolução por microscopia eletrônica de varredura (Figura 6.22), e a imagem tridimensional foi reconstruída, na qual o capsídio é dominado por dímeros que definem as 30 unidades morfológicas.<sup>122</sup>

Análise filogenética das cepas do HEV provenientes de regiões geográficas distintas mostrou variações na sequência de seus genomas e os classificou, em função da divergência dos nucleotídeos em até 20% da ORF2, em quatro genótipos (1, 2,





**Figura 6.22** Estrutura tridimensional do HEV. Resolução por microscopia eletrônica de varredura e reconstrução de imagem tridimensional.<sup>122</sup>

3 e 4) e em 24 subtipos designados pelo número do genótipo seguido de letras (1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f e 4g).<sup>113</sup> O genótipo 1 consiste em uma variedade epidêmica em países em desenvolvimento na Ásia e África e previamente acreditou-se que infectava somente seres humanos, mas recentemente foi detectado em porcos no Camboja.<sup>123</sup> O genótipo 2 tem sido encontrado no México e na África (Nigéria; Chade) apenas em seres humanos.<sup>124</sup> O genótipo 3 é prevalente em rebanhos de suínos nos EUA, na Europa, no Canadá, no México, na Nova Zelândia, na Coreia do Sul, no Japão e na Tailândia. As cepas isoladas do genótipo 3 de vários países demonstraram uma forte relação genética entre suínos e humanos, o que sugere que suínos possam ser o reservatório do vírus, embora seja possível que humanos e suínos possam compartilhar um reservatório comum.<sup>125</sup> O genótipo 4 tem sido isolado de várias regiões da China, incluindo o sul (Guangzhou e Shanghai), o centro (província Henan) e o norte (província Liaoning e Beijing) e tem sido responsável por uma proporção significativa de casos de hepatite aguda.<sup>112</sup> O genótipo 4 encontrado na China pode ser uma zoonose de origem suína. Uma nova cepa do HEV foi isolada de aves (galinhas) com síndrome esplenomegálica de hepatite e foi proposto um novo genótipo (genótipo 5) ou classificá-la em um gênero separado.<sup>124</sup>

## ▪ Transmissão

A principal via de transmissão do HEV é a oro-fecal. Evidência de contaminação fecal em reservatórios de água foi associada a epidemias graves na Índia. Essas epidemias ocorrem principalmente nos meses de inverno, quando há queda do nível de água, concentrando assim os contaminantes, e durante a estação das monções, quando ocorrem enchentes e aumenta o risco de contaminação fecal na água potável. A falta de informação adequada pode ser uma via alternativa de transmissão do HEV. A taxa de transmissão entre os membros das famílias de pacientes portadores de hepatite E aguda é de 1 a 2% dos casos.<sup>126</sup> Infecções pelo HEV por alimentos foram encontradas em pequenos focos no Japão,<sup>127</sup> assim como o desenvolvimento de HEV aguda em pacientes japoneses após ingestão de fitoterápicos chineses.<sup>128</sup> A probabilidade de transmissão parenteral é baixa, mas foi associada a funcionários de hospitais que transmitiram a infecção depois de atenderam pacientes com HEV aguda. Estudos sobre a transmissão do HEV em macacos *Rhesus* também sugerem a possibilidade de transmissão parenteral. Anticorpos IgG contra o HEV são frequentemente detectados em grupos de risco para transmissão parenteral, como recipientes de transfusão, pacientes hemodialisados e em usuários de drogas injetáveis.<sup>113</sup> Não se tem evidências da transmissão sexual, mas o alto índice de anticor-

pos anti-HEV em homossexuais masculinos, na Itália, sugere a possibilidade por essa via. Pode haver também a transmissão vertical pelo HEV, no terceiro trimestre da gravidez, e essa ocorrência tem sido relatada em 50% das mulheres grávidas infectadas pelo HEV.<sup>113</sup>

O ser humano é o hospedeiro natural para o HEV, mas é muito possível que a hepatite E seja uma zoonose. Animais podem servir de reservatório e amplificar o vírus para infectar humanos. Algumas espécies de primatas não humanas são suscetíveis à infecção pelo HEV, como micos (*Saguinus mystax*), macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), *Rhesus* (*Macaca mulatta*), macacos-coruja (*Aotus trivigatus*), chimpanzés (*Pan troglodytes*), macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) e macacos-rabo-de-porco (*Macaca nemestrina*).<sup>129,130</sup> O curso da infecção em primatas infectados experimentalmente é similar ao de humanos, com algumas variações no período de incubação.<sup>131</sup> Estudos de campo em várias partes do mundo detectaram o RNA viral nas fezes e os anticorpos no soro de animais domésticos como suínos, gado, burro, veado, roedores, mulas, mangustos e outros animais.<sup>111,132-136</sup> Isolados do HEV de suínos criados no EUA<sup>137</sup> foram infecciosos para primatas,<sup>138</sup> e análises filogenéticas mostraram que eram altamente homólogos aos isolados humanos dos EUA, mas diferentes das linhagens mexicana e birmanesa.<sup>139</sup> Evidência definitiva da transmissão do animal para o ser humano foi constatada em indivíduos doentes que consumiram carne de veado, pois o vírus isolado era idêntico ao da carne congelada remanescente.<sup>127</sup>

## Clone de cDNA infeccioso

A primeira cepa proveniente de um animal a ser sequenciada e caracterizada foi isolada de porcos nos EUA em 1997 e foi designada como HEV suína. Desde então inúmeras cadeias de HEV foram isoladas de porcos e consideradas zoonóticas nos rebanhos de todo o mundo.<sup>140</sup> Assim como a HEV suína, a de aves também está geneticamente e antigenicamente relacionadas com a HEV humana. Diferentes clones de cDNA da HEV aviária estabeleceram sua infectividade natural *in vitro* e *in vivo*.<sup>141</sup>

## ▪ Evolução clínica

O quadro clínico da hepatite E aguda pode ser dividido em quatro fases ou períodos: incubação, prodromico, icterico e convalescença. O período de incubação é de 15 a 60 dias, com uma média de 40 dias. As manifestações clínicas em humanos são semelhantes às das outras hepatites virais e podem variar de subclínica a doença fulminante. Em alguns indivíduos a hepatite pode ter um curso colestatístico prolongado. A fase pré-ictérica pode durar de 1 a 10 dias e sintomas gastrintestinais como dor epigástrica, náuseas e vômito são frequentemente relatados. A fase icterica inicia-se abruptamente, com aparecimento de icterícia, urina escura e fezes cor de argila. Em casos não complicados, esta fase dura de 12 a 15 dias, e a recuperação completa ocorre dentro de 1 mês. Estudos clínicos mostram que a elevação da ALT ocorre em único pico que precede ou coincide com o início da icterícia, o que é similar aos demais tipos de hepatites virais.<sup>113</sup> Durante epidemias de HEV, observaram-se taxas elevadas de hepatite fulminante e subsequente mortalidade entre mulheres grávidas.<sup>142</sup> Insuficiência hepática fulminante pode ocorrer por encefalopatia dentro de 8 semanas do início dos sintomas da doença.



## ▪ Prevalência

A prevalência geral de anticorpos anti-HEV raramente é maior que 25% da população saudável mesmo em áreas endêmicas como Índia, Tailândia e México. Na maioria dos países, incluindo os mais industrializados como EUA, Alemanha e Japão, a prevalência de anti-HEV é baixa, mas constante. Contudo, em populações não doentes, como doadores de sangue, uma prevalência de anti-HEV de 0,4 a 3% é relativamente alta, considerando a raridade da doença notificada.<sup>143</sup>

No Brasil a prevalência da infecção pelo HEV é pouco estudada, pois os testes para o diagnóstico dessa infecção foram comercializados apenas recentemente. Nas Regiões Nordeste e Centro-Oeste alguns casos de hepatites virais foram associados ao HEV,<sup>144</sup> assim como entre mineradores de ouro da Amazônia<sup>145</sup> e comunidades isoladas.<sup>146</sup> Na Região Sudeste, anticorpos anti-HEV foram encontrados em trabalhadores da saúde e pacientes dialisados.<sup>147</sup>

## ▪ Replicação viral

O ponto primário da replicação do HEV não foi identificado até o momento, mas pode ser o trato intestinal. Ainda não está definido como o vírus chega ao fígado; presume-se que a porta de entrada seja a veia porta. A replicação ocorre no citoplasma dos hepatócitos, o vírus é liberado para a bile e o sangue por mecanismos desconhecidos. A viremia é detectada antes do início da icterícia, podendo durar até 30 dias.<sup>148</sup> A partícula viral pode ser detectada nas fezes em até 34 dias após a exposição.<sup>149</sup> Embora a fase virêmica do HEV seja breve, casos de viremia prolongada foram observados em pacientes acometidos de HEV aguda<sup>150</sup> e em pacientes submetidos a transplante renal e terapia imunossupressora, em que a viremia pode ser detectada após 3 anos da infecção.<sup>151</sup>

## ▪ Diagnóstico laboratorial da hepatite E

### *Pesquisa do RNA viral*

O RNA do HEV é o primeiro marcador a ser detectado no soro, em torno de 22 dias após a infecção, persiste durante a fase pré-ictérica e desaparece no pico de elevação da ALT.<sup>148</sup> Além do soro, também pode ser detectado na bile e nas fezes. Como o período virêmico é curto, a pesquisa do RNA no soro deve ser realizada no início da infecção e nas fezes, na fase prodrômica.

### *Imunomicroscopia eletrônica*

A imunomicroscopia eletrônica (IEM) pode ser utilizada para detecção das partículas virais de 27 a 34 nm nas fezes coletadas durante a fase pré-ictérica e início da fase ictérica.<sup>152</sup>

### *Pesquisa do antígeno do HEV*

O teste imunoenzimático ELISA foi desenvolvido para a detecção do antígeno no soro, usando uma combinação de anticorpos monoclonais contra proteínas do capsídio dos genótipos 1 e 4. Após infecção pelo HEV, o HEVAg foi detectado no soro quase ao mesmo tempo que o RNA do HEV nas fezes, mas o antígeno persistiu 4 semanas a menos do que o RNA viral.<sup>153</sup> Testes para pesquisa do HEVAg devem ser úteis para o diagnóstico do HEV durante o período de janela sorológica.

### *Pesquisa de anticorpos anti-HEV*

Anticorpos IgM anti-HEV aparecem no soro de pacientes infectados no início dos sintomas e permanecem detectáveis por um período de 2 semanas a 3 meses,<sup>148</sup> sendo úteis para o diagnóstico de infecção aguda. Em algumas epidemias

em várias partes do mundo a frequência de anticorpos IgM variou de 43 a 67% nos pacientes.<sup>113,154</sup> A pesquisa de anticorpos IgM anti-HEV necessita ser melhor averiguada em acompanhamentos clínicos, particularmente em áreas endêmicas.<sup>113</sup> Anticorpos IgG anti-HEV aparecem em seguida aos IgM, alcançam níveis mais elevados durante a fase aguda, diminuem na fase de convalescença e permanecem por longo tempo em aproximadamente 47% dos casos.<sup>155</sup> A presença de altos títulos de anticorpos IgG anti-HEV pode presumir fase aguda da infecção mesmo na ausência de IgM. Anticorpos IgA anti-HEV foram encontrados durante infecção recente.<sup>156</sup> Dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e um imunocromatográfico estão disponíveis comercialmente, embora os parâmetros de sensibilidade e especificidade para avaliação do desempenho desses testes não tenham sido precisamente estabelecidos, principalmente na fase de convalescença. Sensibilidade e especificidade de 90% foram alcançadas com um teste imunoenzimático usando uma combinação de três proteínas do HEV.<sup>113</sup>

O anticorpo anti-HEV mostrou-se neutralizante,<sup>157</sup> mas existem controvérsias quanto à existência de imunidade prolongada. Títulos de anti-HEV podem diminuir progressivamente, possibilitando nova infecção após reexposição ou se manter por tempo prolongado após infecção aguda, sugerindo a ocorrência de memória imunológica.<sup>158</sup>

## ▪ Prevenção e tratamento

Há pelo menos três principais abordagens para o controle da infecção pelo HEV: saneamento, imunoprofilaxia e vacina. Uma das medidas de saneamento, considerando que a principal via de transmissão do HEV é fecal-oral, seria assegurar a integridade do abastecimento de água, tratamento adequado na eliminação dos dejetos humanos, higiene pessoal, preparação de alimentos com higiene e evitar o consumo de carnes e vegetais crus e malcozidos. Os primeiros estudos de proteção individual pelo HEV por meio da imunoprofilaxia passiva não tiveram sucesso.<sup>159</sup> Uma única dose de imunoglobulina humana com baixos títulos não conseguiu prevenir a transmissão pelo HEV, mas altos títulos de anticorpos anti-HEV transferidos passivamente conseguiram reduzir a quantidade de vírus eliminado nas fezes em primatas não humanos que foram desafiados com altas doses de HEV.<sup>131</sup> A produção de uma vacina eficaz para o HEV é possível devido à existência de somente um sorotipo. Esse fato incentivou vários grupos de pesquisadores a utilizarem muitas abordagens científicas reconhecidas para essa finalidade.<sup>124</sup>

## ► Hepatites não A, não B, não C, não D, não E (não A-E)

Nos anos 1990 ocorreu o desenvolvimento de ensaios bastante sensíveis para a detecção dos vírus causadores das hepatites C (HCV) e E (HEV). Apesar disso, 20% dos casos de hepatites agudas não A-E não puderam ter suas etiologias determinadas.<sup>160,161</sup> Isso também tem acontecido em significativa proporção de pacientes com doença hepática crônica e cirrose, os quais têm sido caracterizados como casos criptogênicos.<sup>162</sup> Tais evidências indicam a existência de agentes adicionais causadores de hepatites e fortalecem a necessidade de pesquisas para a descoberta desses agentes. Deste modo, o GB vírus C (GBV-C), inicialmente chamado vírus da hepatite G (HGV) e o TT vírus (TTV) foram descobertos em 1995 e 1997, respectivamente, e sugeridos como agentes causais das hepatites não A-E. No entanto, vários estudos



posteriores mostraram que nenhum desses dois agentes foi a causa mais provável dessas hepatites, portanto não havia mais interesse para o desenvolvimento de métodos de triagem na prática clínica para detectá-los. Em 2000, um novo vírus de DNA, chamado vírus SEN (SENV), foi identificado. O SENV mostrou ser um membro do grupo Circoviridae e ser parente distante do TTV. Pelo menos oito cepas SENV foram isoladas, mas apenas duas delas foram relatadas como associadas à hepatite não A-E. Tassopoulos *et al.*, estudando esses vírus, concluíram que, embora HGV, TTV e/ou SENV fossem frequentemente detectados na fase aguda na coorte de hepatite não A-E, nenhum deles estava associado às características específicas do paciente ou de progressão para cronicidade.<sup>160</sup> A maioria dos dados existentes não mostrou relação causal entre esses agentes e as hepatites agudas, permitindo concluir que HGV, TTV e SENV não foram responsáveis pela maioria dos casos, e provavelmente representem transeuntes inocentes. Assim, os resultados dessa coorte sugerem a existência de um novo agente de hepatite, com modos incertos de transmissão.<sup>163</sup> Uma fração substancial dos casos de hepatite aguda desse estudo, que evoluíram para uma fase crônica de hepatite, foi consistente com um suposto agente não A-E que muitas vezes parece ter um curso agressivo com o rápido desenvolvimento de cirrose.

Nos últimos anos, vários agentes virais foram propostos como agente etiológico dos poucos casos de hepatite não A-E de provável etiologia viral, mas nenhum deles conseguiu satisfazer os requisitos necessários para que esta associação fosse comprovada. Alguns autores lançaram a hipótese de que existiria uma chamada “flora viral” análoga à flora bacteriana, formada por agentes não patogênicos que conviveriam com o hospedeiro humano sem causar nenhum prejuízo. Esta hipótese não pode ser desconsiderada, dado que os métodos de biologia molecular atualmente utilizados são altamente sensíveis e podem mesmo levar à descoberta desse tipo de agente. Entretanto, para cada um desses agentes, são necessários estudos cuidadosos antes que eles possam ser declarados definitivamente como inocentes, pois sabemos que alguns agentes virais só são patogênicos em uma pequena porcentagem de casos, como citomegalovírus, parvovírus B19 e HTLV-I/II.<sup>42</sup>

## ► Sumário do diagnóstico laboratorial das hepatites virais

Os Quadros 6.4 a 6.12 resumem alguns tópicos do diagnóstico laboratorial das hepatites virais.

**Quadro 6.4 - Janela imunológica das hepatites B e C.**

Hepatite	Janela imunológica*	
	Testes sorológicos	Testes de biologia molecular
B	30 a 60 dias	25 dias
C	33 a 129 dias (ELISA 2ª geração) 49 a 70 dias (ELISA 3ª geração)	22 dias

\*O conceito de janela imunológica, que é o período compreendido entre a exposição a uma fonte de infecção e o aparecimento de um marcador sorológico, a rigor, não é a denominação correta quando o exame é de biologia molecular. Entretanto, pela falta de uma nomenclatura adequada ao período que corresponde à não detecção do vírus, do antígeno ou do anticorpo, por intermédio dos métodos diagnósticos sanguíneos hoje disponíveis, optou-se por mantê-lo.

**Quadro 6.5 - Hepatite B aguda | Interpretação dos marcadores sorológicos.**

Marcador	Significado
HBsAg	É o primeiro marcador que aparece no curso da infecção pelo HBV. Na hepatite aguda, ele declina a níveis indetectáveis em até 24 semanas
IgM Anti-HBc	É marcador de infecção recente, encontrado no soro até 32 semanas após a infecção
Anti-HBc Total	É marcador presente nas infecções agudas pela presença de IgM e crônicas pela presença de IgG. Representa contato prévio com o vírus
HBeAg	É marcador de replicação viral. Sua positividade indica alta infectiosidade
Anti-HBe	Surge após o desaparecimento do HBeAg, indicando o fim da fase replicativa
Anti-HBs	É o único anticorpo que confere imunidade ao HBV. Está presente no soro após o desaparecimento do HBsAg, sendo indicador de cura e imunidade. Está presente isoladamente em pessoas vacinadas

**Quadro 6.6 - Hepatite B crônica | Interpretação dos marcadores sorológicos.**

Marcador	Significado
HBsAg	Sua presença por mais de 24 semanas é indicativa de hepatite crônica
HBeAg	Está presente enquanto ocorrer replicação viral
Anti-HBe	Sugere redução ou ausência de replicação viral, exceto nas cepas com mutação pré-core (não produtoras da proteína “e”)

**Quadro 6.7 - Hepatite B | Interpretação dos resultados sorológicos.\***

Interpretação	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc			
			IgM	IgG	Anti-HBe	Anti-HBs
Suscetível	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Incubação	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fase aguda	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Fase crônica (antígeno “e” positivo)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
Fase crônica (antígeno “e” negativo)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
Janela imunológica para o anti-HBs	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)/(-)	(-)
Imunidade, infecção passada recente	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Imunidade, infecção passada	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Imunidade, infecção passada	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Imunidade resposta vacinal	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

\*Perfis sorológicos atípicos podem ser encontrados no curso da infecção pelo HBV; tais circunstâncias necessitam da avaliação de um especialista (hepatologista ou infectologista).



**Quadro 6.8 - Hepatite C | Interpretação do marcador sorológico.**

Marcador	Significado
Anti-HCV	Indica contato prévio com o HCV. Não define se foi infecção aguda e curada espontaneamente ou se houve cronificação da doença

**Quadro 6.9 - Hepatite delta | Interpretação dos marcadores sorológicos.**

Marcador	Interpretação
HDVAg	Existe controvérsia sobre a utilidade desse marcador na detecção de hepatite delta. Segundo alguns autores, a antigenemia permite o diagnóstico em amostras de soro obtidas durante a primeira semana da doença. Para outros, o HDVAg é um marcador inconstante, detectado no soro, especialmente na superinfecção
IgM anti-HDV	Esses anticorpos aparecem com os sintomas agudos da doença e, quando disponíveis, servem para o diagnóstico; além disso, são úteis para monitorar os pacientes submetidos à terapia com IFN, uma vez que eles desaparecem quando a doença é resolvida. Constituem os marcadores mais estáveis e são detectados antes de IgG anti-HDV. Existe forte correlação entre o IgM anti-HDV, a presença do RNA do HDV no soro e do HDVAg no núcleo dos hepatócitos
IgG anti-HDV	Esse anticorpo é marcador de infecção passada e de imunidade. Aparece no soro em torno de 12 semanas e é um anticorpo instável

**Quadro 6.10 - Hepatite D | Interpretação dos resultados sorológicos.**

Interpretação	HBsAg	IgM anti-HBc	HDVAg	Antidelta	
				IgM	IgG
Coinfecção* ou superinfecção** recente	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
Coinfecção recente	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Superinfecção recente	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Superinfecção antiga	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Imunidade	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

\*Coinfecção = infecção aguda simultânea pelos HBV e HDV da hepatite.

\*\*Superinfecção = infecção pelo vírus HDV em pacientes crônicos do vírus B da hepatite.

**Quadro 6.11 - Hepatite E | Interpretação dos marcadores sorológicos.**

Anti-HEV total	IgM Anti-HEV	Interpretação
(+)/(+)	(+)	Infecção recente pelo vírus da hepatite E
(+)	(-)	Exposição prévia ao vírus da hepatite E
(-)	(-)	Nunca teve contato com o vírus da hepatite E

**Quadro 6.12 - Comparação das características das hepatites virais humanas.**

Vírus	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Família	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviridae	"Satélite"	Herpesviridae
Genoma	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
Genoma – estrutura	Linear, s	Circular, d	Linear, s	Circular, s	Linear, s
Genoma – tamanho	7,5	3,2	9,5	1,8	7,2
Genótipos	4 <sup>a</sup>	8	6	3	4
ORF	1	4	1	5	3
Polaridade	Pos	Pos/Neg	Pos	Neg	Neg
Tamanho da partícula (nm)	27	42	55 a 65	30 a 36	32 a 34
Envelope	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Transmissão	Entérica	Parenteral	Parenteral	Parenteral	Entérica
Período de incubação (dias) <sup>b</sup>	15 a 50	30 a 180	15 a 150	30 a 180 (na superinfecção 14 a 56 dias)	14 a 60
Início	Abrupto	Insidioso	Insidioso	Abrupto	Abrupto
Cronicidade	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Mortalidade (%)	0,5	1 a 2	0,5 a 1	Alta	1-2 <sup>b</sup>
Vacina	Sim	Sim	Não	Sim	Sim <sup>c</sup>
HCC	Não	Sim	Sim	Sim	Não

s = cadeia simples; d = cadeia dupla; ORF = fase de leitura aberta; HCC = carcinoma hepatocelular. <sup>a</sup>Genótipos do HAV I, II, III e VII, considerado apenas em humanos. Apaire-Marchais, Robertson *et al.* 1995. <sup>b</sup>Acima de 20% durante o terceiro trimestre da gravidez. <sup>c</sup>Estágio final do campo de pesquisa. Mushahwar, 2008.



Muitas vezes é difícil o diagnóstico das hepatites A, B, C, D e E, sendo necessário, para diferenciá-las, fazer testes sorológicos altamente específicos e testes moleculares, apesar das características individuais entre elas, como listado no Quadro 6.12.

## ► Referências bibliográficas

- Blumberg BS. From Australia Antigen to Eradication Programs. Hepatitis B Annual (HBA): table of contents: 10-16, 2004.
- Dane DS, Cameron CH *et al.* Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1(7649): 695-698.
- Choo QL, Kuo G *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902): 359-362.
- Feinstone SM, Kapikian A *et al.* Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182(116): 1026-1028.
- Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 160(2): 213-221.
- Francki RIB, Fauquet CM *et al.* Classification of nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1991; suppl 2: 320-326.
- Apaire-Marchais V, Robertson BH *et al.* Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(11): 3977-3980.
- World Health Organization. Hepatitis A. Geneve, WHO/CDS/CSR/EDC/2000.7, 2000.
- Totsuka A, Moritsugu Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* 1999; 42(2-3): 63-68.
- Pereira FE, Goncalves m CS. Hepatitis A. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(3): 387-400.
- Ramonet M, da Silveira TR *et al.* A two-dose combined vaccine against hepatitis A and hepatitis B in healthy children and adolescents compared to the corresponding monovalent vaccines. *Arch Med Res* 2002; 3(1): 67-73.
- Hilfenhaus JT, Nowak. Inactivation of hepatitis A virus by pasteurization and elimination of picornaviruses during manufacture of factor VIII concentrate. *Vox Sang* 1994; 67 suppl 1: 62-66.
- Seymour IJ, Appleton H. Foodborne viruses and fresh produce. *J Appl Microbiol* 2001; 91(5): 759-773.
- Silva LCA. Hepatites agudas e crônicas. São Paulo: Sarvier, 1995.
- Purcell RH, Feinstone SM *et al.* Hepatitis A vírus. Viral hepatitis and liver disease. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH. Orlando, Florida: Grune & Stratton, 9 a 22, 1984.
- Ministério da Saúde, Brasil. Hepatites Virais: O Brasil está atento. Série B Textos básicos. V. Sanitária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília 1-62, 2008b.
- Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1): 38-58.
- World Health Organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services. Management guidelines, including information for health workers and parents. Geneve, © World Health Organization, 2001.
- Mast EE, Weinbaum CM *et al.* A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55(RR-16): 1-33; quiz CE31-34.
- Hunt CM, McGill JM *et al.* Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000; 31(5): 1037-1044.
- Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24 suppl 1: 3-10.
- Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005; 12(2): 111-124.
- Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Field's Virology. Knipe DM, Howley PM., Chanock, R. M., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2971-3036, 2000.
- Yang WJ, Summers. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *J Virol* 1999; 73(12): 9710-9717.
- Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* 2005; 42(3): 302-308.
- Le Mire MF, Miller DS *et al.* Covalently closed circular DNA is the predominant form of duck hepatitis B virus DNA that persists following transient infection. *J Virol* 2005; 79(19): 12242-12252.
- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
- Takei K. Infecções transfusionais. In: Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. Imuno-ensaios – Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242-247, 2007.
- Herrera JL. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *South Med J* 1994; 87(7): 677-684.
- Rodriguez-Frias F, M. Buti *et al.* Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22(6): 1641-1647.
- Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 351-366.
- Hoofnagle JH, E. Doo *et al.* Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2007; 45(4): 1056-1075.
- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 14-21.
- Victoria Fda, S, Oliveira CM *et al.* Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(1): 27-37.
- Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Brasil. Guia Estadual de Orientações. Técnicas das Hepatites Virais, Superintendência de Epidemiologia, Gerência de Vigilância Epidemiológica, 108, 2007.
- Mendonça JSA, Vigani G. História natural da hepatite B aguda e crônica. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2006; 10 suppl 1: 15-18.
- Gluud LL, Gluud C. Meta-analyses on viral hepatitis. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(2): 315-330.
- Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51(4): 798-809.
- Joller-Jemelka HI, Wicki AN *et al.* Detection of HBs antigen in "anti-HBc alone" positive sera. *J Hepatol* 1994; 21(2): 269-272.
- Dow BC, Yates P *et al.* Hepatitis B vaccinees may be mistaken for confirmed hepatitis B surface antigen-positive blood donors. *Vox Sang* 2002; 82(1): 15-17.
- Chazouilleres O, Mamish D *et al.* "Occult" hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994; 343(8890): 142-146.
- Pinho JR. Hepatites não A, não B, não C, não D, não E (não A-E). In: Tratado de Hepatites Virais. R. Focaccia. São Paulo: Atheneu: 343-368, 2006.
- Zhu Y, Yamamoto T *et al.* Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* 2001; 75(1): 311-322.
- Lopes MH. Prevenção da hepatite B e delta. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2006; 10 suppl 1: 72-78.
- Almeida AM, Silva DI. *et al.* Efficacy of interferon (conventional, pegylated) and lamivudine for treatment of chronic hepatitis B: a systematic review. *Cad Saúde Pública* 2009; 25(8): 1667-1677.
- Pramoolsinsup C. Management of viral hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 suppl: S125-145.
- European Association For The Study of The, L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50(2): 227-242.
- Alter HJ. Chronic consequences of non-A, non-B hepatitis. In: Seef LB, Lewis JH. Current perspectives in hepatology. New York: Plenum Press, 83-97, 1989.
- Zein NN. The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Cleve Clin J Med* 2003; 70 suppl 4: S2-6.
- Manzini P, Saracco G *et al.* Human immunodeficiency virus infection as risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission; persistence of anti-hepatitis C virus in children is associated with the mother's anti-hepatitis C virus immunoblotting pattern. *Hepatology* 1995; 21(2): 328-332.
- Thimme R, Oldach D *et al.* Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194(10): 1395-1406.
- Farci P, Alter HJ *et al.* A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 325(2): 98-104.
- Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 suppl 1): S21-29.
- Seeff LB. The natural history of hepatitis C – A quandary. *Hepatology* 1998; 28(6): 1710-1712.
- Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1): 17-35.
- Farci P, Alter HJ *et al.* Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; 258(5079): 135-140.
- NIH. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements 2002; 19(3): 1-46.
- Dev AT, McCaw R *et al.* Southeast Asian patients with chronic hepatitis C: the impact of novel genotypes and race on treatment outcome. *Hepatology* 2002; 36(5): 1259-1265.



59. Magiorkinis G, Magiorkinis E *et al.* The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med* 2009; 6(12): e1000198.
60. Diário Oficial da União, Brasil. Portaria nº 863 de 04 de novembro de 2002. Resolve aprovar o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Hepatite Viral Crônica C – Interferon-alfa, interferon-alfa peguillado, Ribavirina, na forma do anexo desta Portaria. Brasília, Diário Oficial da União, Brasília, 160 a 174, 2002.
61. Diário Oficial da União, Brasil. Portaria nº 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria n.721/GM, de 09 de agosto de 1989, que aprova normas técnicas para a coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. Revogada pela Portaria nº 103, de 06/02/2003. M. d. Saúde, Diário Oficial da União, Brasília, 18405-18415, 1993.
62. Salles NA, Sabino EC *et al.* The discarding of blood units and the prevalence of infectious diseases in donors at the Pro-Blood Foundation/Blood Center of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 13(2 a 3): 111-116.
63. Focaccia R, da Conceição OJ *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the Municipality of Sao Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz J Infect Dis* 1998; 2(6): 269-284.
64. Campioto S, Pinho JR *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(1): 41-49.
65. Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology. Fildes BN, Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott-Raven, 931-959, 1996.
66. Bukh J, Apgar CL. Five new or recently discovered (GBV-A) virus species are indigenous to New World monkeys and may constitute a separate genus of the Flaviviridae. *Virology* 1997; 229(2): 429-436.
67. Choo QL, Richman KH *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(6): 2451-2455.
68. van der Poel CL, Cuypers HT *et al.* Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994; 344(8935): 1475-1479.
69. Maertens G, Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: Harrison T, Zuckerman A. The molecular medicine of viral hepatitis. New York: John Wiley, 183-234.
70. Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* 1999; 3(4): 693-716, vii.
71. Kleter B. Characterization of hepatitis C virus isolates from chronically infected patients. Rotterdam: Erasmus University, 182, 1995.
72. Simon N, Courouce AM *et al.* A twelve year natural history of hepatitis C virus infection in hemodialyzed patients. *Kidney Int* 1994; 46(2): 504-511.
73. Lefrere JJ, Guiramaud S *et al.* Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1997; 175(2): 316-322.
74. Poignet JL, Degos F *et al.* Complete response at interferon-alpha for acute hepatitis C after needlestick injury in a hemodialysis nurse. *J Hepatol* 1995; 23(6): 740-741.
75. Bossi V, Galli C. Quantitative signal of anti-VHC by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2004; 30(1): 45-49.
76. Pawlotsky JM, Lonjon I *et al.* What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998; 27(6): 1700-1702.
77. Fabrizi F, Poordad FF *et al.* Hepatitis C infection and the patient with end-stage renal disease. *Hepatology* 2002; 36(1): 3-10.
78. Burioni R, Mancini N *et al.* Humoral immune response against hepatitis C virus. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17(2): 125-127.
79. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4407-4412.
80. Neville JA, Prescott LE *et al.* Antigenic variation of core, NS3, and NS5 proteins among genotypes of hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12): 3062-3070.
81. Nubling CM, Unger G *et al.* Sensitivity of VHC core antigen and VHC RNA detection in the early infection phase. *Transfusion* 2002; 42(8): 1037-1045.
82. Alter MJ, Kuhnert WL *et al.* Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003; 52(RR-3): 1-13, 15; quiz CE11-14.
83. Barreto AM, Takei K *et al.* Cost-effective analysis of different algorithms for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41(2): 126-134.
84. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122(6): 1554-1568.
85. Stuyver L, Rossau R *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gene Virol* 1993; 74 (Pt 6): 1093-1102.
86. Manns MP, McHutchison JG *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358(9286): 958-965.
87. Neumann AU, Lam NP *et al.* Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2000; 182(1): 28-35.
88. Abrignani S, Houghton M *et al.* Perspectives for a vaccine against hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 suppl 1: 259-263.
89. Xie ZC, Riezu-Boj JI *et al.* Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 1998; 244(2): 513-520.
90. Zhao X, Tang ZY *et al.* Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2002; 109(2): 221-232.
91. Liang TJ, Rehermann B *et al.* Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132(4): 296-305.
92. Rizzetto M, Canese MG *et al.* Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/antidelta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18(12): 997-1003.
93. WHO. Hepatitis Delta. Geneva, WHO/CDS/CRS/2001.1, 2001.
94. Rizzetto M, Canese MG *et al.* Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis* 1980; 141(5): 590-602.
95. Rizzetto M, Verme G. Delta hepatitis. *Internist (Berl)*, 26(10): 628-632, 1985.
96. Niro GA, Casey JL *et al.* Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *J Hepatol* 1999; 30(4): 564-569.
97. Fonseca JCF. Hepatite delta. In: Fonseca JCF. Hepatite delta. Manaus: Imprensa Universitária, 1-66.
98. Wu JC, Chen TZ *et al.* Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 1995; 108(3): 796-802.
99. Gunsar F. Delta hepatitis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(5): 499-501.
100. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after. *J Hepatol* 2009; 50(5): 1043-1050.
101. Shih HH, Jeng KS *et al.* Hepatitis B surface antigen levels and sequences of natural hepatitis B virus variants influence the assembly and secretion of hepatitis d virus. *J Virol* 2008; 82(5): 2250-2264.
102. Philipp T, Durazzo M *et al.* Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D. *Lancet* 1994; 344(8922): 578-581.
103. Hsieh TH, Liu CJ *et al.* Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *J Formos Med Assoc* 2006; 105(11): 869-881.
104. Negro F, Rizzetto M. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol* 1995; 22(1 suppl): 136-139.
105. Borghesio E, Rosina F *et al.* Serum immunoglobulin M antibody to hepatitis D as a surrogate marker of hepatitis D in interferon-treated patients and in patients who underwent liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27(3): 873-876.
106. Niro GA, Rosina F *et al.* Treatment of hepatitis D. *J Viral Hepat* 2005; 12(1): 2-9.
107. Castelnau C, Le Gal F *et al.* Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* 2006; 44(3): 728-735.
108. Ciancio A, Rizzetto M. Clinical patterns, epidemiology and disease burden of hepatitis D virus chronic liver disease. In: Margolis HS, Alter MJ, Liang TJ *et al.* Proceedings of the 10th International symposium on viral hepatitis and liver disease. Atlanta, GA: International Medical Press, 271-275, 2002.
109. Vishwanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56). A critical study: epidemiology. *Indian J Med Res* 1957; 45: 49-58.
110. Reyes GR, Purdy MA *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247(4948): 335-339.
111. Hsieh SY, Meng XJ *et al.* Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12): 3828-3834.
112. Wang YC, Zhang HY *et al.* Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 2002; 67(4): 516-521.
113. Panda SK, Thakral D *et al.* Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2007; 17(3): 151-180.
114. Berke T, Matson DO. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 2000; 145(7): 1421-1436.
115. Fauquet CM, Fargette D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol J* 2005; 2: 64.
116. Kannan H, Fan S *et al.* The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J Virol* 2009; 83(13): 6375-6382.



117. Tam AW, Smith MM *et al.* Hepatitis E virus (VHE): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 185(1): 120-131.
118. Bradley D, Andjapardze A *et al.* Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J Gene Virol* 1988; 69 (Pt 3): 731-738.
119. Jameel S, Zafrullah M *et al.* Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* 1996; 70(1): 207-216.
120. Bradley D, Purdy M. Molecular and Serological characteristics of Hepatitis E virus. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda TS-V. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo: Springer-Verlag, 42-45, 1994.
121. Li L, Zhu Y *et al.* Full-genome nucleotide sequence and analysis of a Chinese swine hepatitis E virus isolate of genotype 4 identified in the Guangxi Zhuang autonomous region: evidence of zoonotic risk from swine to human in South China. *Liver Int* 2009; 29(8): 1230-1240.
122. Xing L, Kato K *et al.* Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* 1999; 265(1): 35-45.
123. Caron M, Enouf V *et al.* Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3440-3442.
124. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80(4): 646-658.
125. Huang FF, Haqshenas G *et al.* Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1326-1332.
126. Khuroo MS, Duermeier W *et al.* Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in India. *Am J Epidemiol* 1983; 118(3): 360-364.
127. Matsuda H, Okada K *et al.* Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003; 188(6): 944.
128. Ishikawa K, Matsui K *et al.* Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *J Gastroenterol* 1995; 30(4): 534-538.
129. Ticehurst J, Rhodes Jr LL *et al.* Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J Infect Dis* 1992; 165(5): 835-845.
130. Jameel S, Durgapal H *et al.* Enteric non-A, non-B hepatitis: epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37(4): 263-270.
131. Tsarev SA, Emerson SU *et al.* Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J Infect Dis* 1993; 167(6): 1302-1306.
132. Clayson ET, Innis BL *et al.* Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(3): 228-232.
133. Kabrane-Lazizi Y, Fine JB *et al.* Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(2): 331-335.
134. van der Poel WH, Verschoor F *et al.* Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(6): 970-976.
135. Huang FF, Haqshenas G *et al.* Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11): 4197-4202.
136. Tei S, Kitajima N *et al.* Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362(9381): 371-373.
137. Meng XJ, Purcell RH *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(18): 9860-9865.
138. Meng XJ, Halbur PG *et al.* Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 1998; 72(12): 9714-9721.
139. Meng XJ, Halbur PG *et al.* Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine VHE), but not with human strains of VHE. *Arch Virol* 1998; 143(7): 1405-1415.
140. Meng XJ. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; 278: 185-216.
141. Huang FF, Pierson FW *et al.* Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (VHE), avian VHE. *J Gene Virol* 2005; 86(Pt 9): 2585-2593.
142. Hamid SS, Jafri SM *et al.* Fulminant hepatic failure in pregnant women: acute fatty liver or acute viral hepatitis? *J Hepatol* 1996; 25(1): 20-27.
143. Smith JL. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 2001; 64(4): 572-586.
144. Souto FJ, Fontes CJ *et al.* Short report: further evidence for hepatitis E in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57(2): 149-150.
145. Pang L, Alencar FE *et al.* Short report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 347-348.
146. Souto FJ, Fontes CJ. Prevalence of IgG-class antibodies against hepatitis E virus in a community of the southern Amazon: a randomized survey. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92(5): 623-625.
147. Focaccia R, Sette Jr H *et al.* Hepatitis E in Brazil. *Lancet* 1995; 346(8983): 1165.
148. Chauhan A, Jameel S *et al.* Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 341(8838): 149-150.
149. Panda SK, Jameel S. Hepatitis E virus: from epidemiology to molecular biology. *Vir Hep Rev* 1997; 3: 227-251.
150. Nanda SK, Ansari IH *et al.* Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108(1): 225-230.
151. Banas B, Tausch U *et al.* Autochthonous hepatitis E-virus infection in an immunocompromised patient. First report of a chronic course and molecular characterization of the virus. *Z Gastroenterol* 2005; 43:405.
152. Balayan MS, Andjapardze Ag *et al.* Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20(1):23-31.
153. Zhang F, Li X *et al.* Detection of VHE antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol* 2006; 78(11): 1441-1448.
154. Lin CC, Wu JC *et al.* Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (VHE) tests based on VHE RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 3915-3918.
155. Clayson ET, Myint KS *et al.* Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 1995; 172(4): 927-933.
156. Nascimento AS, Moreira RC. Hepatite E: Atualização. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60(1): 71-77.
157. Koretz RL. Acute Hepatitis: single papers two reelers. In: Gitnick GL. *Current Hepatology*. St Louis: Mosby, 1-42, 1994.
158. Arankalle VA, Chadha MS *et al.* Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *J Hepatol* 1999; 30(2): 199-204.
159. Khuroo MS, Dar MY. Hepatitis E: evidence for person-to-person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an Indian source to prevent it. *Indian J Gastroenterol* 1992; 11(3): 113-116.
160. Tassopoulos NC, Hatzakis A *et al.* Role of hepatitis C virus in acute non-A, non-B hepatitis in Greece: a 5-year prospective study. *Gastroenterology* 1992; 102(3): 969-972.
161. Alter HJ, Sanchez-Pescador R *et al.* Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat* 1995; 2(3): 121-132.
162. Kodali VP, Gordon SC *et al.* Cryptogenic liver disease in the United States: further evidence for non-A, non-B, and non-C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(10): 1836-1839.
163. Tassopoulos NC, Papatheodoridis GV *et al.* Clinicopathological features and natural history of acute sporadic non-(A-E) hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(8 Pt 1): 1208-1215.



## Capítulo 7

---

# Infecção por HIV\*

*José Pascoal Simonetti e  
Sandra Regina Rodrigues Simonetti*

- Considerações gerais em virologia e biologia molecular, 98
- Epidemiologia, 103
- Fármacos antirretrovirais, 105
- Diagnóstico laboratorial, 108
- Bibliografia, 110

---

\* Parte deste capítulo integra a tese de doutorado em Ciências Médicas de Sandra R. R. Simonetti, intitulada *HIV-1: avaliação da resistência às drogas antirretrovirais em pacientes pediátricos*, defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2009 no Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).



## ► Considerações gerais em virologia e biologia molecular

Os vírus da imunodeficiência humana (HIV), gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, foram classificados, de acordo com propriedades estruturais e genômicas, em dois tipos, HIV-1 e HIV-2 (Myers e Pavlakis, 1992). O HIV-1, originalmente descrito por pesquisadores liderados por Luc Montagnier e Robert Gallo (Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Gallo *et al.*, 1984), apresenta três principais grupos de linhagens similares, designados M (*major* ou *main*), O (*outlier*) e N (*new* ou *non-M/non-O*) (Gutler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998).

A maioria das infecções devidas ao HIV-1 é causada por linhagens agrupadas em M, geneticamente distintas, reconhecidas como subtipos filogenéticos ou *clades*. Para o HIV-1, essas linhagens se classificam de “A” a “H”, “J” e “K”, e, para o HIV-2, de “A” a “E” (Gao *et al.*, 1994). O grupo O é formado por algumas linhagens presentes em Camarões, Gabão e Guiné Equatoriana, e o grupo N é representado por linhagens observadas, até o momento, somente em Camarões.

Em 2009, um novo vírus, associado às linhagens do vírus da imunodeficiência de símios observadas em gorilas (*SIV<sub>gor</sub>*), foi isolado em uma paciente em Camarões. Esse vírus, distinto dos grupos anteriores do HIV-1, é considerado o protótipo de uma nova linhagem (Plantier *et al.*, 2009).

### ■ Morfologia e estrutura viral

Células suscetíveis, linfócitos ou monócitos, infectadas pelo HIV-1 e HIV-2 produzem partículas virais bastante similares em sua morfologia e composição (Munn *et al.*, 1985). As partículas virais completas, *vírions*, em formato esférico, com aproximadamente 110 nm de diâmetro, apresentam envoltório externo, constituindo uma membrana lipídica de camada dupla (envoltório ou envelope) que circunda o capsídeo e o nucleocapsídeo viral, em forma de cone (Figura 7.1).

A membrana lipídica, derivada da célula hospedeira, contém aproximadamente 72 espículas com simetria triangular (Gelderblom, 1991), que se apresentam com 9 a 10 nm de comprimento com terminação distal arredondada, com 14 a 15 nm de diâmetro, contendo quatro heterodímeros da glicoproteína do envelope, compostos por subunidades de superfície que interagem com as subunidades transmembrana. As subuni-

dades de superfície e transmembrana estão associadas, respectivamente, às glicoproteínas virais gp120 e gp41 para HIV-1 e gp130 e gp41 para HIV-2, ligadas não covalentemente. A glicoproteína de superfície (SU) constitui o principal antígeno viral e a proteína transmembrana (TM) forma o componente interno do envelope glicoproteico.

Durante a etapa de brotamento, no processo de formação da partícula viral, várias proteínas da membrana celular hospedeira podem ser adquiridas e incorporadas à membrana viral lipoproteica, principalmente  $\beta_2$ -microglobulina, proteínas HLA das classes I e II e ciclofilinas (Arthur *et al.*, 1992).

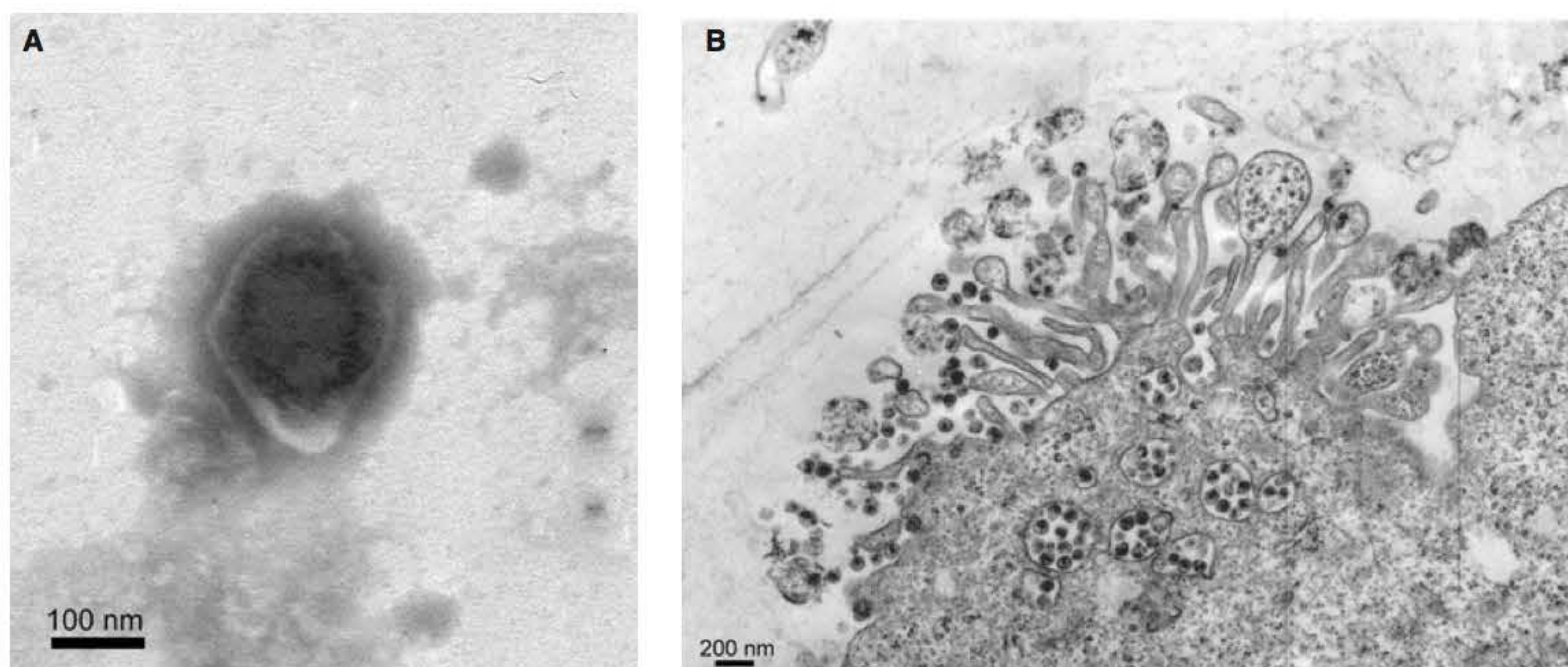
Proteínas de adesão, como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), também podem ser incorporadas, o que facilita a adesão a outras células-alvo. Além disso, pode ocorrer também a incorporação de lipídios, e há a seleção, por proteínas virais, de regiões específicas da membrana plasmática celular para a liberação do nucleocapsídeo.

A porção mais estreita do nucleocapsídeo, com 20 nm de largura, está conectada à membrana lipídica por meio de uma estrutura proteica, a ligação cápside-envelope (Höglund *et al.*, 1992). Cada nucleocapsídeo contém duas moléculas de RNA genômico de cadeia simples, proteínas de membrana e enzimas virais.

O nucleocapsídeo viral (NC) é composto pela proteína p17, que constitui a matriz (MA), e pelo capsídeo viral (CA), que engloba o genoma RNA, as proteínas p24, p9, p7, a enzima transcriptase reversa (RT) (p66/p51), essencial ao processo de replicação viral, a enzima protease (p10), necessária à maturação das partículas virais e a enzima integrase (p31), responsável pela integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira. Catalisada pelo polipeptídeo In (parte do complexo RTase), a integração é uma reação altamente específica em relação ao provírus, mas aleatória em relação ao DNA da célula hospedeira. Moléculas de tRNA em geral específicas a triptofano, prolina ou lisina, usadas no início do processo de transcrição reversa, também são observadas no capsídeo viral.

### Organização do genoma viral

O genoma viral, com 9,7 kb de extensão, apresenta-se com duas fitas simples, positivas, associadas à nucleoproteína p7, formando o complexo ribonucleoproteico. Em ambas as extremidades, são observadas sequências nucleotídicas repetidas (*long terminal repeat* – LTR). A estrutura LTR é essencial ao processo de replicação viral, uma vez que a região U3 de LTR



**Figura 7.1** A. Microscopia eletrônica de partícula HIV purificada. B. Partículas virais em processo de brotamento em cultura de célula (Barth, 2011).



contém elementos promotores responsáveis pelo início da transcrição do genoma viral.

A replicação viral, na maioria dos retrovírus competentes, depende da participação de genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*), genes reguladores ou regulatórios (*tat*, *rev*, *nef*) e genes acessórios (*vpu*, *vpr*, *vif*, para HIV-1; *vpu*, *vpr*, *vpx* para HIV-2). Os polipeptídeos precursores de proteínas do vírion são codificados por essas regiões específicas do genoma viral (Wong-Staal, 1991).

O esquema estrutural clássico do genoma retroviral é indicado pela expressão 5'LTR-*gag-pol-env*-LTR3'. As regiões LTR representam as duas partes delimitantes do genoma viral. São conectadas ao DNA celular da célula hospedeira, após a integração, e não codificam para quaisquer proteínas virais.

O gene *gag* codifica precursores de proteínas do capsídeo viral: a proteína da matriz (MA), formada pela unidade p17; a proteína do capsídeo (CA), formada pela unidade p24, e a proteína do nucleocapsídeo (NC), formada pela unidade p7.

O gene *pol* codifica precursores das enzimas protease, transcriptase reversa (RT) e integrase, essenciais ao processo de replicação retroviral.

A enzima protease (PR), composta pela subunidade p10, atua na maturação das partículas virais, no processo de formação das partículas, e em 11 sítios de clivagem de poliproteínas precursoras do HIV-1, *gag* e *gag-pol*, e três sítios envolvem as ligações fenilalanina-prolina ou tirosina-prolina, dando origem às proteínas estruturais codificadas pelo gene *gag* e enzimas virais codificadas pelo gene *pol* (Darke *et al.*, 1988).

A transcriptase reversa transcreve o genoma viral RNA de cadeia simples em DNA proviral de cadeia dupla e é formada por duas subunidades, p51 e p66. A subunidade p51 não apresenta o domínio RNase H, que é observado somente como parte da subunidade p66 da enzima transcriptase reversa viral. Esse domínio apresenta como função a degradação do RNA viral de fita simples nos híbridos RNA-DNA, liberando o DNA molde para a síntese do genoma viral (Telesnitsky e Goff, 1997).

A enzima integrase (In), formada pela unidade p32, atua na ligação covalente do DNA viral linear de cadeia dupla ao genoma da célula hospedeira (Brown, 1997).

O gene *env* codifica precursores (gp160) das glicoproteínas de envelope (gp120 ou subunidade SU) com sítios específicos de ligação aos receptores celulares e glicoproteínas transmembrana (gp41 ou subunidade TM) ligadas à fusão vírus-célula e célula-célula (Lifson *et al.*, 1986), responsáveis pela indução de sincícios em culturas de células.

Variações na sequência do gene *env* têm revelado um padrão de cinco regiões variáveis intercaladas com regiões conservadas para a subunidade gp120. Diferentemente, a subunidade gp41 demonstra menor heterogeneidade e, portanto, é mais conservada. Essa variação consiste em alterações em nucleotídeos, que resultam em substituições de aminoácidos, pequenas deleções e inserções (Leigh-Brown, 1991). Até 25% dos aminoácidos codificados por *env* podem variar em linhagens HIV-1 de regiões separadas geograficamente (variação interpaciente). Análises de sequências de isolados HIV-2 também demonstram cinco regiões variáveis, intercaladas com sequências conservadas na subunidade gp120 (Burns e Desrosiers, 1994).

A seleção de variantes *env* produz populações de genomas virais intimamente relacionadas, mas distintas, designadas *quasispecies* (variantes intrapacientes) (Wain-Hobson, 1992). Variações nas sequências *env* têm importantes implicações não só nas respostas imunes antivirais, mas também na ligação ao CD4, tropismo celular e citopatogenicidade.

A heterogeneidade na sequência genômica pode ocorrer por pressões seletivas: o escape a anticorpos que neutralizam a atividade viral e a adaptação a diferentes tipos de células (Burns e Desrosiers, 1994).

### Genes virais acessórios e regulatórios

Adicionalmente aos genes *gag*, *pol* e *env*, o genoma do HIV codifica outros genes classificados, anteriormente, como genes acessórios ou auxiliares, uma vez que não eram requeridos nos processos de replicação *in vitro*.

Os genes adicionais codificados pelo HIV-1 são os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpu* e genes regulatórios *tat*, *rev* e *nef*. Para o HIV-2 são os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpx* e regulatórios *tat*, *rev* e *nef*.

Os genes regulatórios *nef*, *tat* e *rev* são produzidos precocemente durante o ciclo de replicação viral. As sequências *tat* (transativador de transcrição) e *rev* (regulador da expressão viral) codificam a produção de pequenas proteínas externas ao vírion, essenciais à replicação viral. São proteínas regulatórias que se acumulam no interior do núcleo e se ligam em regiões definidas do RNA viral.

O gene *tat* se liga à região TAR (elementos de resposta transativação), encontrada em LTR; controla a transcrição da expressão genética, aumentando os níveis de RNA viral e elevando a transcrição inicial e/ou alongamento (Peterlin *et al.*, 1993). Atua como potente ativador da transcrição da região promotora de LTR e é essencial para o processo de replicação viral em quase todos os sistemas de cultura *in vitro*.

O gene *rev* se liga à região RRE (elementos de resposta *rev*), encontrada no gene *env*, e controla a replicação viral em nível pós-transcrição, regulando o processamento e o transporte do RNA viral do núcleo ao citoplasma (Parslow, 1993).

Ambos, *tat* e *rev*, são fundamentais no processo de replicação viral, uma vez que estimulam a transcrição do DNA HIV-1 proviral em RNA, promovem o alongamento da cadeia de RNA, aumentam o transporte do RNA HIV do núcleo para o citoplasma e são essenciais para a tradução. O gene *rev* é, também, um fator de exportação nuclear, importante para a troca de proteínas reguladoras de expressão precoce por proteínas estruturais sintetizadas posteriormente.

Todos os lentivírus de primatas codificam *nef* (fator negativo), ao qual são atribuídas diversas funções, tais como aumento da infectividade viral (Bukrinsky *et al.*, 1991), ativação de células T (Baur *et al.*, 1994) e regulação de CD4 (Aiken *et al.*, 1994). A expressão precoce de *nef*, no ciclo de replicação viral, assegura a ativação de células T e o estabelecimento de um estado persistente da infecção. Além disso, promove a sobrevivência de células infectadas, atuando na expressão de várias moléculas de superfície, importantes para a função do sistema imune do hospedeiro. Essas moléculas incluem o complexo principal de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), presente em células apresentadoras de antígeno (APC) e células-alvo (linfócitos T CD4+, CD28+) (Collins *et al.*, 1998).

Numerosos estudos têm sido publicados sobre as funções dos genes acessórios, levando em consideração diversos fatores, como diferenças entre as linhagens virais, multiplicidade da infecção, tipos celulares selecionados para análise e métodos utilizados para avaliar a replicação viral. As atribuições dadas a esses genes acessórios serão descritas a seguir.

O fator de infectividade viral (*vif*) participa dos processos de replicação (Strebel *et al.*, 1987) e maturação viral (Höglund *et al.*, 1992). Dados da literatura têm ressaltado um importante papel de *vif* em relação à replicação viral (Mariani *et al.*, 2003). Isolados HIV-1, deficientes em *vif*, não replicam em células



T CD4+, determinadas linhagens de células T não permissivas ou em macrófagos. Esses isolados são capazes de infectar células-alvo e iniciar a transcrição reversa; entretanto, a síntese do DNA proviral permanece incompleta.

A fusão *in vitro* de células permissivas e não permissivas leva ao fenótipo não permissivo, sugerindo que a replicação do HIV dependa da presença ou ausência de um inibidor celular. Esse fator inibitório endógeno foi identificado como a enzima catalítica apolipoproteína B, semelhante ao polipeptídeo 3G, atuando na edição do mRNA (APOBEC3G) (Sheehy *et al.*, 2002). Essa proteína pertence à família de enzimas intracelulares que, especificamente, desaminam a citosina em uracila no mRNA ou DNA, resultando no acúmulo de mutações G-A, que leva à degradação do DNA viral.

Por meio da formação de complexos com APOBEC3G, *vif* bloqueia a atividade inibitória dessa enzima, prevenindo a sua incorporação às partículas virais recentemente sintetizadas (Freed, 2004). Assim, inibidores específicos, que possam bloquear a interação de *vif* com APOBEC3G, ou que previnam a degradação intracelular desta enzima, poderiam representar promissoras opções de tratamentos futuros, pois, a princípio, o bloqueio de estruturas celulares estaria provavelmente associado ao risco mínimo de desenvolvimento de resistência, que pode comprometer a eficácia de agentes antirretrovirais.

Em relação aos genes *vpr/vpx*, está bem definido que o HIV-1 apresenta o gene *vpr* (codificante para proteína viral R), enquanto o HIV-2 contém *vpx* (codificante para proteína viral X), associado o Vpr por homologia de sequências.

Atribui-se a *vpx* desempenho na adaptação do vírus a espécies primatas (Clements e Wong-Staal, 1992), e estudos para o gene *vpr* têm sugerido sua participação na regulação da expressão de genes celulares e virais, alterando o mecanismo da célula hospedeira e facilitando a replicação viral. A proteína Vpr desempenha importante papel na regulação da importação, para o núcleo, do complexo de pré-integração do HIV-1 e é requerida para a replicação viral em macrófagos. Além disso, a Vpr também é capaz de interferir no ciclo de replicação celular, induzindo à apoptose e resultando em disfunção imune. O papel imunossupressor é atribuído à sua capacidade de sequestrar ativadores de transcrição pró-inflamatórios no citoplasma (Muthumani *et al.*, 2006).

O gene *vpu* (codificante para proteína viral U) está presente em HIV-1 e ausente em HIV-2 e demais lentivírus. Está envolvido no processo de brotamento das partículas virais e aumento da liberação de vírions em células infectadas. Vírus deficientes em *vpu* replicam em células T CD4+ e macrófagos; porém, há declínio acentuado na eficiência da liberação de vírions no meio extracelular (Klimkait *et al.*, 1990).

## ▪ Dinâmica viral e quasispecies

A infecção pelo HIV-1 é um processo dinâmico em que se observa equilíbrio entre a produção e eliminação de partículas virais, de acordo com estudos de quantificação da carga viral em plasma e células mononucleares do sangue periférico de pacientes nos diferentes estágios de AIDS. Em indivíduos infectados, é estimado o valor médio de  $10^9$  novas partículas virais sendo produzidas e subsequentemente eliminadas por dia (Ho *et al.*, 1989).

O estado de constante equilíbrio e a elevada taxa de mutação genômica do HIV-1 resultam no desenvolvimento de linhagens virais mutantes, selecionadas de maneira mais eficaz sob condições de pressão seletiva, exercida pelo sistema imunológico ou pela intervenção farmacológica com antirretrovirais.

Essas variantes não são reconhecidas por anticorpos neutralizantes e linfócitos T citotóxicos e podem apresentar mutações nos genes que codificam para as enzimas envolvidas no mecanismo de replicação viral, o que resulta na substituição de aminoácidos e seleção das *quasispecies* resistentes aos antirretrovirais (Wang *et al.*, 2002). Em decorrência, esses fármacos não exercem sua função de maneira adequada e a replicação viral se processa normalmente.

A resistência aos antirretrovirais, assim como outros fatores, tais como potência inadequada da medicação, níveis farmacológicos inadequados, não adesão e/ou interações medicamentosas, contribuem para o decréscimo da eficiência da quimioterapia antirretroviral, dificultando não apenas a conduta clínica em relação à doença viral, mas também as opções de tratamento.

## Subtipos genéticos do HIV-1

O HIV-1 caracteriza-se por extensa heterogeneidade genética, resultante da interferência de vários fatores, tais como ausência da capacidade de edição da enzima transcriptase reversa (Roberts *et al.*, 1988), elevada taxa da dinâmica viral *in vivo* (Ho *et al.*, 1995), pressões seletivas exercidas pelo sistema imune do hospedeiro (Michael, 1999) e eventos de recombinação de genes durante o processo de replicação viral (Temin, 1993). No grupo M do HIV-1, a média da variabilidade genética intersubtipos é de 15% para o gene *gag* e 25% para o gene *env* (Janssens *et al.*, 1994; Gao, 1996).

Além dos subtipos já classificados, é possível identificar, neles, grupos de isolados virais que formam *clades* geneticamente relacionadas, denominadas subsubtipos (Robertson *et al.*, 2000). Esses grupos apresentam-se filogeneticamente mais relacionadas entre si do que aos outros subtipos. Isso ocorre com as *clades* A e F, com cepas virais classificadas em subsubtipos A1 e A2, F1 e F2 (Gao *et al.*, 2001; Triques *et al.*, 2000).

As *clades* B e D estão mais intimamente relacionadas entre si do que aos demais subtipos, e a *clade* D é considerada o precursor da variante *clade* B africana, mas suas designações originais como subtipos são mantidas pela consistência de trabalhos publicados (Louwagie *et al.*, 1993).

A classificação de subtipos do HIV-1 foi originalmente fundamentada em regiões subgenômicas de genes individuais. Entretanto, com o aumento do número de isolados virais disponíveis em todo o mundo e as melhorias em métodos de sequenciamento, a sua classificação filogenética baseia-se, atualmente, tanto em sequências de nucleotídeos derivadas de múltiplas regiões subgenômicas (*gag*, *pol*, *env*) do mesmo isolado, como na análise da sequência do genoma completo.

Esse procedimento tem revelado isolados virais nos quais as relações filogenéticas, com diferentes subtipos, são trocadas em seus genomas. Acredita-se que essas formas recombinantes intersubtipos originaram-se em indivíduos infectados com cepas virais de dois ou mais subtipos.

Quando um recombinante viral idêntico é isolado em, no mínimo, três pessoas não relacionadas epidemiologicamente e é caracterizado pelo sequenciamento do genoma completo, ele pode ser designado com uma forma recombinante circulante (CRF).

Mais de 20 CRF, cujas origens podem ser rastreadas, em áreas onde linhagens parentais são cocirculantes, têm sido relatadas. A cocirculação de múltiplos subtipos e CRF nas mesmas populações aumenta a probabilidade de que indivíduos tornem-se “superinfectados” com diferentes formas genéticas do HIV-1. Essas formas podem sofrer trocas de



segmentos de seu material genético, o que resulta na geração de vários recombinantes, chamados de formas recombinantes únicas (URF), que, se disseminadas a outras pessoas, irão gerar as CRF (McCutchan, 2006).

## ▪ Replicação viral

O ciclo de replicação dos lentivírus de primatas divide-se em duas fases: inicial e tardia. A primeira inicia-se com a ligação do vírion aos receptores de superfície celular, por meio da ligação de gp120 aos receptores de superfície celular, CD4, com posteriores processos de internalização e descapsidação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Figura 7.2).

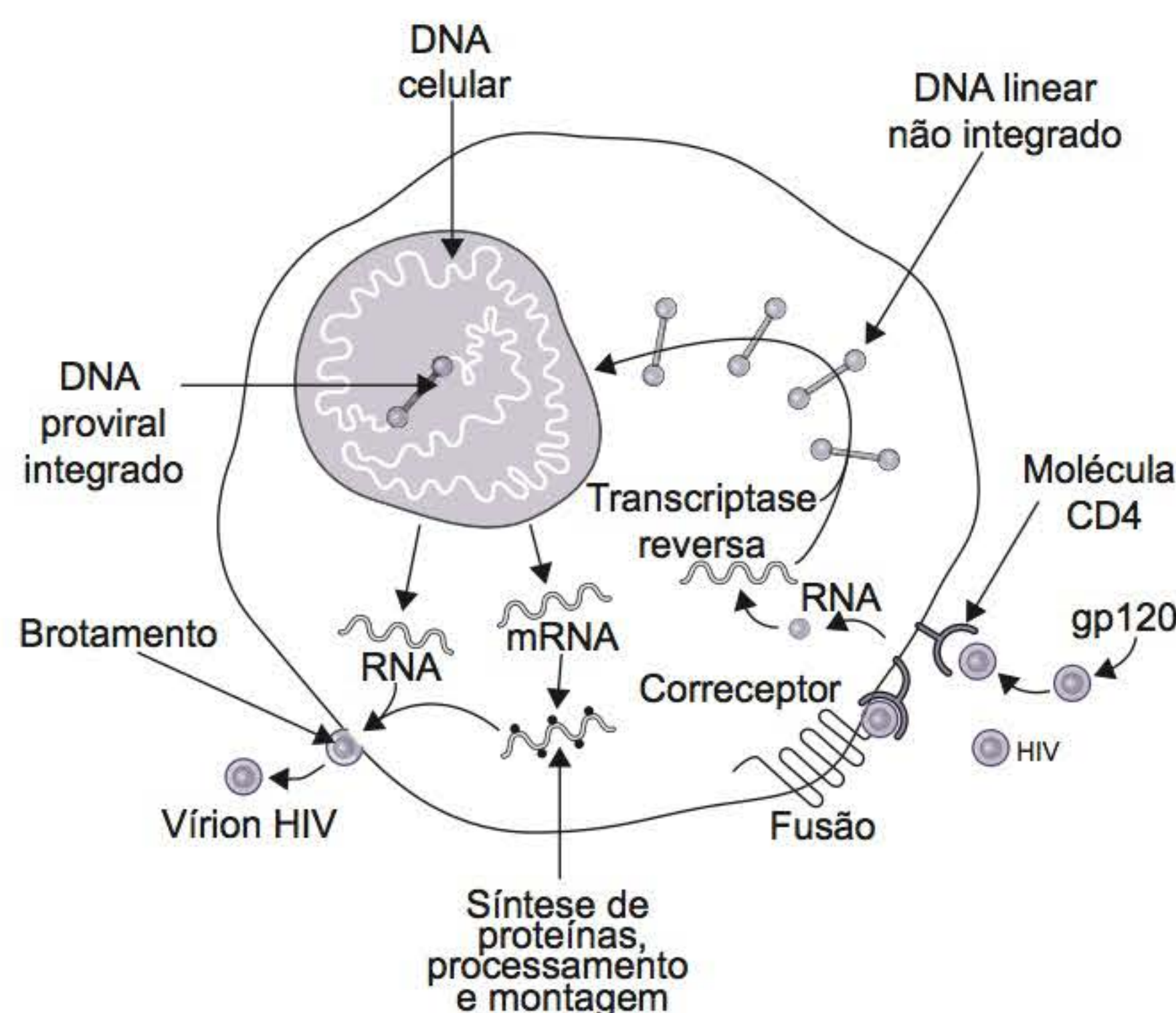
O domínio CD4 atua como receptor primário para o HIV no processo da infecção viral. Ele consiste em uma glicoproteína monomérica, com 58 kDa, detectada na superfície celular de cerca de 60% dos linfócitos T, em precursores de células T na medula óssea e timo, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células da micróglia do sistema nervoso central.

São observadas três regiões distintas em CD4 de células T: o domínio extracelular, composto de 370 aminoácidos, o domínio hidrofóbico transmembrana, com 25 aminoácidos, e a parte citoplasmática, com 38 aminoácidos.

No domínio extracelular, foram caracterizados quatro domínios semelhantes a imunoglobulinas, identificados como regiões D1-D4. Resíduos na região V2, que compreende os aminoácidos 40 a 55, são importantes para a ligação à gp120 e esta região se sobrepõe à parte de CD4 onde ocorre a inserção de seus ligantes naturais (moléculas HLA da classe II).

A ligação de gp120 ao CD4 não é apenas uma etapa crucial para a penetração do vírus nas células; ela também interfere na via de transdução de sinal intracelular e promove apoptose em células T CD4<sup>+</sup> (Banda *et al.*, 1992).

Receptores de citocinas quimiotáticas (quimiocinas) atuam como correceptores de CD4 na infecção celular pelo HIV. As quimiocinas e seus receptores têm sido caracterizados em relação ao seu papel em promover a migração (quimiotaxia) de leucócitos e sua atividade pró-inflamatória. O CXCR4 ( $\alpha$ -quimiocina) foi descrito como o correceptor para isolados HIV com tropismo para células T (T-trópicos) (Feng *et al.*, 1996), e o correceptor CCR5 ( $\beta$ -quimiocina) é necessário para isolados HIV monócitotrópicos (M-trópicos) (Doranz, 1996).



**Figura 7.2** Etapas do ciclo de replicação viral.

A ligação de gp120 ao CD4 e correceptores celulares induz à alteração conformacional em gp120, que promove uma interação mais eficiente da alça V3 de gp120 com o seu respectivo correceptor. A fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira é dependente dessa interação e também de gp41, uma glicoproteína transmembrana, parte do envelope glicoproteico gp160.

Após os processos de adsorção da partícula viral às células suscetíveis e fusão com a membrana da célula hospedeira, ocorre a descapsidação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular, e as enzimas virais transcriptase reversa, protease e integrase permanecem associadas ao nucleocapsídeo.

Ocorre, a seguir, a etapa de transcrição reversa: por meio da ação da transcriptase reversa, catalisando a síntese e polimerização do DNA, e da atividade RNase H da transcriptase reversa, clivando cadeias de RNA, o RNA genômico de cadeia simples é convertido em DNA de cadeia dupla.

O processo de transcrição reversa ocorre no citoplasma da célula, em uma série de etapas, descritas a seguir (Goff, 2001; Rubbert *et al.*, 2007):

- Um tRNA celular específico de lisina atua como iniciador (*primer*) e acopla-se ao sítio complementar do genoma viral denominado sítio de ligação do *primer* (*primer binding site*, PBS)
- O DNA complementar liga-se à região U5 (região não codificante) e à região R do RNA viral (uma repetição direta presente em ambas as terminações da molécula de RNA)
- O domínio da enzima transcriptase reversa denominado RNase H degrada a terminação 5' do RNA, removendo U5 e R
- O *primer* desloca-se para a extremidade 3' do genoma viral e a cadeia de DNA recentemente sintetizada acopla-se à região R complementar no RNA
- A primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) é estendida e a maior parte do RNA viral é degradada pela RNase H
- Finalizada esta etapa inicia-se, a partir do trato polipurina (região PTT), a síntese da segunda cadeia de DNA, que é a cadeia senso (+)
- Ocorre uma nova etapa de deslocamento: o PBS da segunda cadeia acopla-se ao PBS complementar na primeira cadeia
- Ambas as cadeias são estendidas, o que resulta no DNA HIV de cadeia dupla com regiões LTR em ambas as extremidades.

Essas formas são mantidas em um complexo nucleoproteico, que é subsequentemente transportado ao núcleo e podem ser integradas ao genoma hospedeiro pela enzima viral integrase, produzindo o provírus integrado: a integrase se liga ao DNA viral transcrito e forma o complexo de pré-integração (PIC). Uma vez incorporada ao PIC, a integrase atua no terminal 3' removendo o dinucleotídeo GT de ambas as extremidades do DNA viral. A seguir, o PIC é transportado do citoplasma ao núcleo da célula infectada e a integrase catalisa a reação de transferência da cadeia, o que resulta na incorporação do DNA viral ao DNA celular.

A ativação celular, promovida *in vivo* por contato com antígenos ou infecções oportunistas, é necessária para a integração do DNA HIV proviral ao genoma da célula hospedeira após o transporte do complexo de pré-integração ao núcleo.

A segunda fase do ciclo de replicação viral ocorre com a transcrição e processamento do RNA viral a partir do cDNA proviral, contendo nas extremidades 5' e 3', respectivamente, as estruturas *cap* e *poli-A*, finalizando com a liberação de partículas virais pelo processo de brotamento.



Inicialmente, a transcrição resulta na síntese precoce de proteínas reguladoras do HIV-1, como Tat ou Rev (Freed, 2004). Tat liga-se ao sítio de elemento de resposta transativação (TAR), no início da síntese do RNA HIV-1 no núcleo, e estimula a transcrição e formação de longos transcritos RNA. Rev ativa a expressão de genes estruturais e enzimáticos e inibe a produção de proteínas reguladoras, promovendo, desta maneira, a formação de partículas virais maduras.

As proteínas codificadas pelos genes *gag* e *pol* formam o núcleo das partículas maduras. As proteínas codificadas pelo gene *gag* derivam de moléculas precursoras maiores, com 53kDa, clivadas, pela enzima viral protease, em p24, p17, p9 e p7.

Os produtos codificados por *env* formam as espículas gp120 do envelope viral, a partir de moléculas precursoras maiores, gp160, também clivadas pela protease do HIV-1 em gp120 e gp41.

A clivagem de moléculas precursoras é necessária à geração de partículas virais infecciosas (vírions). O processo de formação de novas partículas ocorre em etapas, descritas a seguir: (1) o cerne das partículas virais é formado por RNA HIV-1, proteínas codificadas por *gag* e várias enzimas codificadas por *pol*; (2) este complexo migra para a superfície da célula, em sítios onde houve a deposição de gp120 e gp41; (3) moléculas precursoras maiores são clivadas pela protease, resultando em partículas virais (vírions) pelo processo de brotamento através da membrana da célula hospedeira. Durante esse processo, membranas lipídicas virais podem incorporar várias proteínas da célula hospedeira, tornando-se enriquecidas em certos fosfolípidios e colesterol.

Em células T, o brotamento das partículas virais ocasiona sua liberação no espaço extracelular e, em monócitos e macrófagos, resulta no acúmulo de vírions em vacúolos celulares.

A replicação dos retrovírus é tendenciosa à ocorrência de erros e caracterizada por elevada taxa de mutações espontâneas. A enzima transcriptase reversa do HIV-1 não tem função de edição, e os erros que surgem na formação do DNA de cadeia dupla constituem a fonte da extensa heterogeneidade genética do HIV. Estima-se que a taxa de mutação desse processo seja de  $10^{-4}$ , o que resulta, em média, em 1 a 10 erros por genoma a cada ciclo completo de replicação.

## ■ Patogênese

Infecções causadas por lentivírus cursam, tipicamente, como doenças crônicas, apresentando longos períodos de latência clínica, replicação viral persistente e o envolvimento do sistema nervoso central. Entretanto, o curso da infecção pelo HIV-1 em determinados pacientes pode variar dramaticamente, mesmo em casos de infecções primárias provenientes de origens comuns (Liu *et al.*, 1997).

Em alguns indivíduos são observadas infecções não progressivas de longo termo, que se caracterizam pela ausência do declínio no número de células T CD4+ ou infecções crônicas que persistem, no mínimo, por 7 anos sem o desenvolvimento de AIDS. Nesses pacientes foram observados isolados virais identificados como vírions defectivos ou com reduzida capacidade de replicação (Kirchhoff *et al.*, 1995). Porém, na maioria dos casos, a infecção caracteriza-se pela presença de vírus com efetiva capacidade de replicação e elevada taxa diária de reposição de vírions.

Fatores do hospedeiro também podem determinar se o curso da infecção evoluirá, rapidamente, para a imunodeficiência clinicamente manifesta ou para o perfil de não progressores de longo termo, que representam cerca de 5% de todos os pacientes infectados (Buchbinder *et al.*, 1994; Lefrère *et al.*, 1997).

A identificação e caracterização de fatores do hospedeiro que contribuem para o curso da infecção pelo HIV, incluindo mecanismos de defesa imunológicos e fatores genéticos, são cruciais para a compreensão da imunopatogênese da infecção pelo HIV e para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e profiláticas.

## ■ HIV e sistema imune

Após a penetração do HIV-1 em células T CD4+ quiescentes e a finalização da etapa de transcrição reversa, o genoma viral apresenta-se como DNA proviral não integrado. A ativação de células T CD4+ é necessária para a integração do DNA do HIV no genoma da célula hospedeira, preferencialmente em genes ativos, denominados *hot spots* (Schröder, 2002), e é pré-requisito para a síntese de novos vírions.

O microambiente dos tecidos linfoides representa o meio ideal para a replicação de novos vírions, propiciando condições especiais tais como o íntimo contato entre as células T CD4+ e células apresentadoras de antígeno, a presença de vírions infecciosos na superfície de células dendríticas foliculares e a abundante produção de citocinas proinflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ , que promovem a indução da replicação viral nas células infectadas e aumentam essa replicação em células já produtoras de vírus (Rubbert *et al.*, 2007).

A replicação viral em tecidos linfoides é, realmente, extensa nos estágios iniciais da doença (Pantaleo, 1993). Durante a fase inicial da infecção pelo HIV-1, observa-se enorme quantidade de partículas virais no plasma, seguindo-se relativo declínio da viremia na maioria dos pacientes. Uma forte e intensa resposta de células T citotóxicas específicas para o HIV-1 é gerada, coincidindo com a supressão da viremia plasmática.

Os vírions são englobados pela rede de células dendríticas foliculares nos tecidos linfoides e os macrófagos, células T CD4+ ativadas e quiescentes são os principais alvos da infecção. Se uma análise sequencial do tecido linfóide for realizada durante o curso natural da doença causada pelo HIV-1, será observado que a progressão da doença é refletida pela destruição da arquitetura do tecido linfóide com decréscimo no englobamento de partículas virais (Rubbert *et al.*, 2007).

Vários estudos imuno-histológicos indicam que o paracórTEX dos linfonodos representa o sítio primário onde a replicação do HIV-1 é iniciada (Pantaleo, 1993). A infecção de células T CD4+ circundantes e o início da ativação de células T por células dendríticas contribuem para a disseminação do HIV-1 no tecido linfóide.

Reservatórios virais permanentes, principalmente em macrófagos e células T CD4+ latentemente infectadas, são estabelecidos na fase precoce da infecção e, provavelmente, representam o principal obstáculo à bem-sucedida erradicação do HIV (Rubbert *et al.*, 2007). A frequência de células que contêm o DNA proviral é cerca de 5 a 10 vezes maior em tecidos linfoides em relação às células mononucleares do sangue periférico, e a diferença na replicação viral em tecidos linfóides excede aquela do sangue periférico em 10 a 100 vezes.

Linfócitos B e T são considerados as principais células efetoras da resposta imune antígeno-específica. Entretanto, as suas funções estão sob o controle de células dendríticas, capazes de selecionar antígenos no sangue periférico. O reconhecimento de antígenos por células T requer o processamento prévio e apresentação de peptídeos antigênicos pelas células dendríticas (Rubbert *et al.*, 2007).

As células T expressam diferentes receptores que podem se ligar a peptídeos MHC da classe I na superfície de célu-



las dendríticas para permitir a ativação de células T CD8+ ou moléculas MHC da classe II para a ativação de células T CD4+. Assim, a geração da resposta imune específica ao HIV depende do padrão individual do sistema HLA, que pode afetar a resposta imune adaptativa. Dependendo do padrão de secreção de citocinas, as células T CD4+ podem diferenciar-se em células T *helper*, T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2. As células T CD4+ T<sub>H</sub>1 produzem, primariamente, interleucina 2 (IL-2) e interferona gama (IFN $\gamma$ ), as citocinas que dão suporte às funções efetoras do sistema imune: linfócitos T citotóxicos (CTL), células *natural killer* (NK-cells) e macrófagos. As células T<sub>H</sub>2 produzem, predominantemente, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, citocinas que favorecem o desenvolvimento da resposta imune humoral (Rubbert *et al.*, 2007).

A associação entre a resposta imune humoral específica ao HIV e o curso da doença é menos caracterizada. Indivíduos não progressores de longo termo tendem a apresentar ampla atividade de anticorpos neutralizantes dirigidos a uma variação de isolados primários e mostram a persistência de anticorpos neutralizantes contra vírus autólogos. Entretanto, ainda não se sabe se esses anticorpos representam parte da proteção ou se meramente refletem a integridade de um sistema imune relativamente intacto. Indivíduos com substancial risco para a infecção pelo HIV, mas que são considerados expostos e não infectados, representam, por definição, aqueles que não apresentam resposta de anticorpos detectáveis contra o HIV-1. Essa definição implica que a resposta humoral sistêmica talvez não represente um mecanismo crucial de proteção (Rubbert *et al.*, 2007).

### Imunopatogênese da infecção pelo HIV em pediatria

Em crianças infectadas pelo HIV por meio da transmissão vertical, o período da infecção aguda é o período neonatal, caracterizado por níveis de carga viral extremamente elevados, que declinam mais lentamente do que em adultos nos próximos 2 anos ou mais, até atingirem um valor de *set-point* (Tiemessen e Kuhn, 2006). *Set-points* virais são maiores em crianças do que em adultos, consistentes com a progressão mais rápida da doença (Shearer *et al.*, 1997). Na ausência de terapia efetiva, cerca de um quarto das crianças infectadas progride à AIDS e 10 a 15% vão a óbito no primeiro ano de vida (The European Collaborative Study, 1994).

A via de contaminação mãe-filho envolve, por definição, a transmissão de vírus entre indivíduos geneticamente similares, e essa similaridade pode ser maior para alelos mais comuns. Uma vez que a resposta imune materna molda a evolução de vírus autólogos e mãe e filho são geneticamente similares, a criança adquire linhagens virais que já apresentam mutações de escape à resposta imune (Tiemessen e Kuhn, 2006). Crianças que adquirem a infecção pelo HIV por transfusões sanguíneas, tendem a apresentar melhor prognóstico do que crianças que a contraem por via vertical (Frederick *et al.*, 1994). Assim, a similaridade genética mãe-filho pode desempenhar papel importante para a explicação das diferenças observadas na história natural da infecção pelo HIV entre crianças e adultos (Tiemessen e Kuhn, 2006).

No início da vida o sistema imune de crianças é imaturo, pois a resposta imune específica ou adaptativa, mediada por células T e B, é pequena ou quase inexistente, dependendo da exposição prévia a antígenos. Essa capacidade desenvolve-se com o aumento da exposição a diferentes estímulos antigênicos. O sistema imune inato, em contraposição, é designado para constituir uma resposta imediata após a exposição a microrganismos, promovida por células dendríticas, células

*natural killer*, células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), mastócitos e proteínas humorais tais como complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas antimicrobianas. Em decorrência da alteração do ambiente imune no início da vida, tipos celulares ligados à imunidade inata e adquirida emergem como importantes fatores na patogênese da infecção pelo HIV em pediatria (Tiemessen e Kuhn, 2006).

Azzoni *et al.* (2005) demonstraram que a porcentagem e função de células NK e plasmacitoides (principal população celular produtora de IFN $\alpha$ ) e células dendríticas mieloides encontravam-se deterioradas em crianças infectadas pelo HIV, independentemente da carga viral, em particular naquelas com história clínica de porcentagens decrescentes de células T CD4+. Os seus resultados indicaram que podem existir diferenças entre adultos e crianças na reconstituição imune inata, seguida à terapia antirretroviral altamente potente (HAART).

Outras células que emergem, de maneira crítica, na ligação entre a imunidade adaptativa e inata são as células T *natural killer*, que expressam receptores específicos para antígenos glicolipídicos e compartilham similaridades fenotípicas e funcionais com células T e células NK. Essas células têm sido encontradas como alvo para a infecção produtiva pelo HIV e são seletivamente depletadas durante o curso da infecção, em adultos e crianças (van der Vliet *et al.*, 2002).

Estudos sobre a imunidade específica ao HIV têm demonstrado que apenas a fração de células T CD8 específicas ao HIV tem a capacidade de produzir citocinas e quimiocinas importantes em suas funções antivirais (Scott-Algara *et al.*, 2005).

As células T CD4 desempenham importante papel auxiliando tanto na resposta de anticorpos como na resposta de linfócitos T citotóxicos. A manutenção da integridade dessas células é crucial para o controle da progressão da doença causada pelo HIV. Chakraborty *et al.* (2005) ressaltaram que respostas de células T CD4+ específicas ao HIV são prontamente detectadas em crianças não progressoras que sobrevivem por períodos prolongados.

## ► Epidemiologia

### ■ Meios de transmissão

Os principais meios de aquisição da infecção pelo HIV são a transmissão sexual, incluindo a via heterossexual e contato homossexual; a transmissão parenteral, predominante entre usuários de drogas ilícitas injetáveis, e a transmissão perinatal.

Embora a descrição inicial da doença tenha sido feita em homens homossexuais, a transmissão heterossexual responde por mais de 80% das infecções e mais de 50% das pessoas infectadas pelo HIV, em todo o mundo, são mulheres.

A elevada taxa de infecção em mulheres resultou em grande número de crianças infectadas, pois a contaminação pelo HIV pode ocorrer *in utero*, durante o nascimento ou por aleitamento materno. A transmissão mãe-filho responde por 90% dos casos de infecção em crianças em todo o mundo. Na África Subsaariana, a soroprevalência para HIV em mulheres grávidas é extremamente elevada, com valores estimados entre 20 e 40%. Mais de 95% das crianças são infectadas por transmissão perinatal. Outros meios de transmissão viral, como transfusão de sangue e derivados, transmissão sexual e abuso de drogas ilícitas, são bem menos prevalentes.

Em regiões com poucos recursos, a prevenção da transmissão pelo aleitamento materno continua sendo o principal foco



na pesquisa da transmissão mãe-filho. Esforços para reduzi-la incluem a terapia antirretroviral materna e a profilaxia neonatal durante o período de aleitamento ou modificações nas práticas de aleitamento. Por outro lado, em países mais desenvolvidos, o advento de uma terapia antirretroviral altamente potente resultou em redução bastante significativa nas taxas de transmissão mãe-filho, atingindo níveis equivalentes a 1 a 2%. Além disso, nesses países, o aleitamento materno por mães reconhecidamente infectadas é fortemente desencorajado (Niehues e Lyall, 2007).

Foram estabelecidos dois padrões evidentes de epidemia para a infecção pelo HIV-1 em pacientes pediátricos. Um deles ocorre em países mais desenvolvidos ou nos quais tenham sido adotadas políticas diferenciadas de prevenção e tratamento, e caracteriza-se por baixas taxas de infecção, sobrevida prolongada, complicações decorrentes da terapia antirretroviral crônica, aderência à medicação e resistência antirretroviral. O oposto a esse padrão é observado em países em desenvolvimento, onde a ausência do diagnóstico precoce, o acesso tardio aos cuidados médicos e a ausência de opções de tratamento resultam em elevada e precoce mortalidade (Mofenson, 2008).

Na infecção pelo HIV adquirida por via parenteral, o uso de drogas ilícitas injetáveis responde pelo aumento da epidemia na Europa Central e Ocidental, em alguns países da Ásia e Oriente Médio e em nações industrializadas, estimando-se em 15,9 milhões o número de pessoas infectadas, usuárias de drogas ilícitas injetáveis, em todo o mundo (Arasteh e Jarlais, 2008; Mathers *et al.*, 2008).

## ▪ Dados estatísticos

Até o final de dezembro de 2010 foram estimados 33 milhões de pessoas infectadas pelo HIV/AIDS em todo o mundo, e o número de mortes, desde o início da epidemia, em 35 milhões. Na população pediátrica, foram estimados 2,5 milhões de crianças infectadas com menos de 15 anos de idade, e 25 milhões de órfãos (UNAIDS, 2010).

Dos 33 milhões de pessoas infectadas, 22,5 vivem na África Subsaariana, com metade deste valor registrado em mulheres. Observou-se, nessa região, que a taxa de prevalência em adultos apresenta-se estabilizada em 5%, atribuindo-se a estabilização à redução da incidência e ao aumento no número de indivíduos infectados com acesso ao tratamento.

Na Ásia, foram estimados 4,9 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, com metade delas registradas na Índia (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Aproximadamente 85% dos casos de transmissão do HIV, na Índia, são atribuídos ao contato sexual. Na China, dados governamentais estimam em 1 milhão o número de pessoas infectadas pelo HIV, que equivale, na população em geral, à prevalência de 0,05% (Gill e Okie, 2007). Dentre os novos casos de infecção, 49% foram atribuídos ao uso de drogas ilícitas e aproximadamente 50% à transmissão sexual.

Nas Américas, com 3 milhões de adultos e 58 mil crianças infectados, o Caribe ocupa posição de destaque, apresentando a segunda maior taxa de soroprevalência mundial (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Nos EUA, em 2009, foi estimado o total de 1,2 milhão de pessoas infectadas. Observou-se que os homens foram responsáveis por cerca de três quartos do número de infecções entre adolescentes e adultos. Entre as mulheres, a categoria predominante de transmissão do HIV foi o contato heterossexual de alto risco, implicado em 80% dos

casos de novas infecções (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Na América Latina e Caribe, foi estimado o total de 1,6 milhão de pessoas vivendo com HIV/AIDS, das quais 57 mil eram crianças abaixo de 15 anos de idade. O Brasil responde pela maioria do número de casos totais, tanto em adultos quanto na população pediátrica. Desde o início da epidemia, em 1980, o Brasil registrou, até junho de 2011, 608.230 casos da doença, com taxa de incidência de 17,9 casos por 100 mil habitantes, estando o maior número de casos acumulados concentrado na Região Sudeste, com índices de 56%. Em nosso país, embora haja mais casos da doença em homens do que em mulheres, foi constatado, gradualmente, um aumento proporcional de número de casos em mulheres, tendo sido registrado, em 2010, 1,7 caso em homens para cada 1 em mulheres. A faixa etária de maior incidência é a de 25 a 49 anos, com a via sexual como forma de transmissão mais frequente. Na população pediátrica com menos de 5 anos de idade, observou-se expressiva redução do número de casos de AIDS: em 2000, foram registrados 863 casos e, em 2010, 482 casos; a diferença equivale a um decréscimo de 55%. O resultado é decorrente da implantação de medidas governamentais para redução da transmissão vertical do HIV.

## ▪ Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1

Estudos em epidemiologia molecular têm demonstrado que, com exceção da África Subsaariana, onde quase todos os subtipos virais, formas recombinantes circulantes (CRF) e várias formas recombinantes únicas (URF) têm sido detectados, existe um padrão específico para a distribuição geográfica dos subtipos de HIV-1 (Hemelaar *et al.*, 2006).

Esse padrão de distribuição parece ocorrer tanto em consequência da migração viral acidental quanto da via de transmissão prevalente na região, resultando na predominância de determinado subtipo naquela população.

Em uma escala global, as formas genéticas mais prevalentes de HIV-1 são os subtipos A, B e C, com o subtipo C respondendo por quase 50% das infecções em todo o mundo.

O subtipo A é predominante em áreas da África central e oriental (Quênia, Uganda, Tanzânia e Ruanda) e nos países da Europa Oriental que constituíam a União Soviética.

O subtipo B é a principal forma genética na Europa Central e Ocidental, nas Américas e Austrália e é também comum em vários países do Sudeste Asiático, norte da África e Oriente Médio e entre homossexuais masculinos da África do Sul e da Rússia.

O subtipo C predomina nos países que apresentam índices superiores a 80% de todas as infecções globais pelo HIV-1, como África do Sul e Índia.

A relevância das CRF na pandemia da infecção pelo HIV-1 está bem estabelecida, correspondendo a 18% das infecções. Essas formas representam as cepas virais predominantes no Sudeste Asiático (CRF01-AE) e no oeste e centro-oeste da África (CRF02-AG) (Osmanov *et al.*, 2002).

No Brasil, a maioria de isolados de HIV-1 agrupa-se nos subtipos B e F (Morgado *et al.*, 1994). Entretanto, cepas adicionais, tais como os subtipos A, C e D (Caride *et al.*, 2001; Morgado *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2005) e formas recombinantes B/F e CRF\_02AG (De Sá Filho *et al.*, 2006), também têm sido relatadas.



## ► Fármacos antirretrovirais

Desde 1987, quando a zidovudina foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) como o primeiro antirretroviral a ser utilizado no tratamento de pacientes soropositivos para HIV, 28 compostos encontram-se, atualmente, licenciados e aprovados, divididos em diferentes categorias:

- **Inibidores de RT análogos de nucleosídeo (NRTI):** abacavir (ABC); abacavir/lamivudina/zidovudina (Trizivir®); abacavir/lamivudina (Epzicom®); didanosina (ddI); emtricitabina (FTC); emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato (Truvada®); lamivudina (3TC); lamivudina/zidovudina (Combivir®); estavudina (d4T); zidovudina (AZT, ZDV)
- **Inibidor de RT análogo de nucleotídeo (NtRTI):** tenofovir disoproxil fumarato (TDF)
- **Inibidores de RT não análogos de nucleosídeo (NNRTI):** nevirapina (NVP); delavirdina (DLV); efavirenz (EFV); etravirina (TMC125, ETR)
- **Inibidores de protease (IP):** amprenavir (APV); atazanavir (ATV); darunavir (DRV; TMC 114); fosamprenavir (FPV); indinavir (IDV); lopinavir/ritonavir (Kaletra®); nelfinavir (NFV); ritonavir (RTV); saquinavir mesilato (SQV); tipranavir (TPV)
- **Inibidor de fusão (FI):** enfuvirtida (Fuzeon®; T-20; ENF)
- **Inibidor de correceptor (CRI):** maraviroque (Selzentry®)
- **Inibidor de integrase (INI):** raltegravir (MK-0518).

Outros compostos que aguardam aprovação para o tratamento incluem: rilpivirina (NNRTI), vicriviroc (CRI) e elvitegravir (GS9137) (INI).

Em 2008 foi aprovado o composto Atripla®, que consiste na combinação tripla de fármacos antirretrovirais, formulada como pílula única a ser ingerida 1 vez/dia. O Atripla® contém os fármacos tenofovir disoproxil fumarato (NtRTI), emtricitabina (NRTI) e efavirenz (NNRTI) e age também contra o vírus da hepatite B, devido à similaridade enzimática entre a transcriptase reversa de ambos os vírus, HIV e HBV (De Clercq e Field, 2008).

No Brasil, a produção de antirretrovirais iniciou-se em 1993 e, atualmente, nove compostos são produzidos: zidovudina, didanosina, associação zidovudina e lamivudina, lamivudina, estavudina, indinavir, nevirapina, ritonavir e efavirenz. Em 2010, o Ministério da Saúde anunciou o início da produção de tenofovir.

As classes de fármacos mais frequentemente indicadas para o tratamento da infecção pelo HIV-1 em humanos são os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo e nucleotídeo (NRTI e NtRTI), inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo (NNRTI) e inibidores de protease (IP).

Os inibidores de integrase, recentemente introduzidos na terapia antiviral, atuam diretamente sobre esta enzima, responsável pela integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. Existem, atualmente, vários inibidores de integrase sob avaliação em ensaios clínicos, e o raltegravir tornou-se o primeiro composto a receber aprovação para uso no tratamento antirretroviral, tendo sido licenciado pela FDA, dos EUA, em outubro de 2007.

Além dos fármacos citados, que atuam no processo de replicação viral, têm sido descritos fármacos que previnem a penetração do vírus na célula, atuando como inibidores de fusão e inibidores de correceptor.

O enfuvirtida (Fuzeon®, T-20), peptídeo que corresponde aos aminoácidos 638 a 673 da gp41 (domínio HR2 C-terminal) do HIV-1 (Kilby *et al.*, 1998), foi aprovado pela FDA como o primeiro inibidor de fusão vírus-célula para uso na terapia antirretroviral combinada, no tratamento de adultos e crianças a partir dos 6 anos de idade, em estágio avançado da doença (Lalezari *et al.*, 2003). Esse fármaco se liga, competitivamente, ao domínio HR1 promovendo o bloqueio entre ambos os domínios e a inibição da alteração conformacional em gp41, necessária à fusão vírion-célula hospedeira.

Os inibidores de correceptor previnem a penetração do HIV nas células-alvo. Os antagonistas do correceptor CCR5 atuam por meio da ligação específica a essa molécula, impedindo a sua interação à subunidade viral gp120. Assim, as alterações conformacionais que levam à inserção ao peptídeo de fusão gp41 são prevenidas, bloqueando a penetração viral.

## ■ Inibidores da transcriptase reversa

Os primeiros fármacos de uso clínico, desenvolvidos para o tratamento da doença associada ao HIV-1, foram os NRTI (Furman *et al.*, 1986), que requerem fosforilação à forma trifosfato para inibir a enzima viral.

O mecanismo de ação de todos os compostos análogos de nucleosídeo é semelhante ao da zidovudina (AZT) e consiste na atuação de formas trifosfato como inibidores ativos da RT HIV-1, desempenhando a função de finalizadores de cadeia do processo de transcrição reversa e, assim, inibindo a síntese do cDNA viral (Schinazi, 1993).

A didanosina (ddI) é um pré-produto da didesoxiadenosina (ddA) e evita a toxicidade observada para ddA administrada oralmente. Na célula, ddI é convertida a ddA e o inibidor ativo da RT HIV é, de fato, a didesoxiadenosina trifosfato (ddA-TP).

Os compostos ddA, didesoxicitidina (ddC), didesidro-desoxitimidina (d4T) e tiacitidina (3TC) são fosforilados por enzimas quinase celulares a trifosfato e competem com dATP, dCTP, dTTP e dGTP, respectivamente, pela ligação à RT HIV. O abacavir é um análogo de guanossina e compete com dGTP pela incorporação (Hanna e Hirsch, 2000).

Os NNRTI não requerem o processo de ativação metabólica e não competem com o substrato natural para a ligação à RT HIV-1, mas são capazes de inativar diretamente a enzima por alosteria, ligando-se ao sítio hidrofóbico na subunidade p66 de RT, próximo ao sítio enzimático catalítico (DeClercq, 1997).

Esse sítio específico em RT é funcionalmente relacionado com o sítio de ligação do substrato natural (dNTP), e a ligação dos NNRTI pode, indiretamente, afetar a conformação de resíduos aspartato (Asp-185, Asp-186 e Asp-110), próximos ao sítio ativo da polimerase (Kroeger *et al.*, 1995), levando a um reposicionamento desses resíduos. Assim, os NNRTI podem inibir a RT HIV por bloqueio do sítio ativo em uma conformação inativa, remanescente da conformação da subunidade p51 da RT HIV (Tantillo *et al.*, 1994).

Os NNRTI não apresentam os riscos de efeitos colaterais tóxicos, decorrentes da interferência com o metabolismo dos nucleotídeos e biossíntese de ácidos nucleicos, que estão associados aos NRTI, tais como anemia e neutropenia, e podem atuar logo no início da replicação viral, inativando a RT dentro do próprio vírion (Zhang *et al.*, 1996).

Mais de 25 subclasses diferentes desses compostos têm sido descritas e mostram grande variedade de estruturas



químicas. A hidroxietoximetil fenotiotimina (HEPT) foi o primeiro composto NNRTI a ser identificado como inibidor específico de HIV-1 (Baba *et al.*, 1989), e o MKC-442 é o seu derivado clinicamente ativo (Baba *et al.*, 1994). Entretanto, a nevirapina (NVP) foi o primeiro NNRTI aprovado para uso clínico, após ensaios clínicos multicêntricos demonstrarem o benefício de sua adição aos regimes com AZT e ddI (D'Aquila *et al.*, 1996), o que melhorou os parâmetros virológicos e imunológicos da doença causada pelo HIV.

Outros NNRTI aprovados para uso clínico são delavirdina (bis-heteroarilpiperazina, BHAP, DLV), efavirenz (DMP-266, EFV) e etravirina (TMC125, ETR). Entretanto, a rápida emergência de resistência a DLV e EFV (Saag *et al.*, 1993) e o elevado nível de resistência a ETR, observado em estudos *in vitro* (Brillant *et al.*, 2004), limitaram o seu uso como monoterapia: cada composto deve ser usado em conjunto com outros fármacos antirretrovirais para que haja benefício substancial.

### ■ Inibidores de protease

Os IP são análogos sintéticos e assemelham-se aos aminoácidos, que são reconhecidos e especificamente clivados pela enzima. A forte ligação desses compostos ao substrato enzimático inibe a atividade da protease, impedindo a maturação de partículas virais infecciosas.

Todos os IP atuam no centro ativo enzimático, que pode acomodar sete aminoácidos, responsáveis pela definição da sequência de reconhecimento requerida pela protease do HIV-1 para proceder à clivagem no ciclo de replicação viral. Essa região de ligação consiste em sub-regiões menores, designadas S1, S2 e S3, e cada inibidor da protease liga-se, preferencialmente, a uma ou mais dessas sub-regiões.

A ligação dos IP, interagindo com vários aminoácidos desta região específica, é dependente do tamanho de sua molécula. As mutações selecionadas pelos antirretrovirais afetam, diretamente, o sítio catalítico enzimático, causando resistência aos inibidores pelo decréscimo da capacidade de ligação desses quimioterápicos. O indinavir é o maior deles e interage com o maior número de aminoácidos no dímero protease. O composto que apresenta a menor estrutura molecular conhecida é o amprenavir (Flexner, 1998).

O primeiro IP aprovado para uso humano foi o saquinavir, em 1995, e, em 1996, foram aprovados ritonavir e indinavir.

Todos os IP inibem as enzimas citocromo P450, que metabolizam esses fármacos, sendo o ritonavir o inibidor enzimático mais potente (Denissen *et al.*, 1997). Quando o ritonavir é administrado com outros inibidores de protease, um considerável aumento farmacocinético é observado, o que eleva significativamente o nível plasmático de outros IP (Kempf *et al.*, 1997).

### ■ Terapia antirretroviral altamente potente

O HIV foi descoberto em 1982, mas as estratégias para a intervenção farmacológica foram introduzidas somente 5 anos depois, com a aprovação, pela Food and Drug Administration, dos EUA, do AZT para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Os regimes terapêuticos iniciais perduraram como monoterapia com AZT até 1991, com a liberação da didanosina para o tratamento. A seguir, novos fármacos inibidores da enzima transcriptase reversa viral foram aprovados e o esquema tera-

pêutico passou a consistir na associação de dois compostos. Entretanto, esses esquemas resultavam, frequentemente, em falha no tratamento.

Em 1995, com a aprovação do primeiro composto inibidor da protease viral, saquinavir, deu-se início à terapia antirretroviral altamente potente (HAART), que consiste na administração de, no mínimo, três agentes antirretrovirais, sendo dois inibidores da TR e um inibidor de protease.

A partir dessa modificação, considerável melhoria foi constatada no estado de saúde de pacientes submetidos à terapia antirretroviral, caracterizada por níveis indetectáveis da carga viral que perduravam por períodos prolongados de tempo (Gulick *et al.*, 1997), elevação nos níveis de células T CD4+ revelando melhor estado imunocompetente e melhor expectativa de sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (Palella *et al.*, 1998).

Entretanto, a administração inicial da terapia antirretroviral altamente potente geralmente incluía fármacos com esquemas de dosagem complexos, requerimentos de restrição alimentar, efeitos adversos relacionados com o tratamento e a necessidade da ingestão diária de 16 a 20 comprimidos. Essas barreiras resultavam, frequentemente, em fraca adesão dos pacientes ao tratamento, com subsequente falência terapêutica e o desenvolvimento de linhagens virais resistentes aos compostos inibidores da RT e protease.

Normas atuais e informações contidas em manuais específicos sugerem o início da terapia em pacientes que apresentem sinais e sintomas clínicos definindo a síndrome da imunodeficiência adquirida, independentemente da contagem de células T CD4+ ou da carga viral, ou, em pacientes assintomáticos, com contagem de células T CD4+ equivalente a 350 células/mm<sup>3</sup> ou abaixo deste valor.

Em pacientes que apresentem contagens superiores a 350 células/mm<sup>3</sup> e valores de carga viral acima de 100.000 cópias/mL, a decisão de início da terapia fica a critério do médico responsável pelo atendimento ao paciente. Alguns preferem retardar o tratamento e outros consideram o seu início imediato. O tratamento deverá ser postergado em pacientes que apresentem contagens de células T CD4+ acima de 350 células/mm<sup>3</sup> e cargas virais abaixo de 100.000 cópias/mL.

Quando há indicação para o início da terapia, a seleção dos fármacos apropriados baseia-se em diferentes fatores, como gravidez, presença de comorbidades (doença hepática, depressão, doenças cardiovasculares), potencial de aderência (regimes de dosagem, quantidade de comprimidos, frequência das doses), restrições alimentares (dosagens em relação às refeições), efeitos adversos dos fármacos e potencial de interação dos antirretrovirais incluídos no tratamento.

Nos últimos 10 anos, novos agentes antivirais foram introduzidos no esquema terapêutico, visando propiciar melhorias na aderência dos pacientes submetidos ao tratamento, tais como dosagens mais convenientes, com menor número de comprimidos a serem ingeridos; alterações na formulação e farmacocinética, resultando em redução na frequência das dosagens ou na quantidade de pílulas; e dosagens coformuladas, contendo dois ou mais fármacos em um único comprimido.

Outros aperfeiçoamentos incluíram o aumento da potência de novos agentes, fármacos eficazes contra linhagens virais altamente resistentes, melhorias no perfil de efeitos adversos (diminuição de efeitos gastrointestinais, melhoria do perfil lipídico) e o reforço dos inibidores de protease com ritonavir, potente inibidor da ação do citocromo p450.



## ▪ Mutações e resistência aos antirretrovirais

Mutações relacionadas com a resistência aos antirretrovirais têm sido relatadas para todos os compostos usados no tratamento de pacientes infectados e, mesmo antes da administração da terapia antiviral, linhagens resistentes podem estar presentes em níveis reduzidos.

Durante a terapia, a manutenção da supressão viral depende do nível preexistente de linhagens resistentes, da taxa de replicação viral e da frequência de mutações necessárias ao desenvolvimento de resistência.

A resistência primária aos fármacos ou resistência transmitida é definida como a resistência observada em indivíduos previamente não tratados. Uma vez que a resistência aleatória aos fármacos ocorre sem exposição aos medicamentos, este tipo de resistência implica a transmissão de vírus mutantes resistentes, tanto diretamente como por meio de um ou mais intermediários, a partir de indivíduos com resistência adquirida.

Indivíduos não tratados previamente incluem pessoas sem tratamento com evidências laboratoriais para a infecção recente (geralmente no período precedente de 6 a 18 meses), os recentemente diagnosticados com infecção de duração incerta e aqueles previamente diagnosticados com infecção de duração incerta.

A infecção primária pelo HIV-1 deve ser distinguida da resistência primária aos fármacos. Na infecção, o termo “primária” é usado para descrever pessoas que tenham sido recentemente infectadas e, na resistência, refere-se a indivíduos com resistência viral transmitida.

A resistência secundária aos fármacos ou resistência adquirida é definida como a forma de resistência desenvolvida em pessoas que tenham sido submetidas à terapia antirretroviral. A resistência adquirida resulta do surgimento da variação genética da população de vírus no indivíduo infectado, seguida pela seleção das variantes resistentes aos fármacos durante a terapia.

### Padrões de resistência viral

Padrões de mutação no gene pol do HIV-1 têm sido relatados para os compostos NRTI, NNRTI e IP usados no tratamento de pacientes infectados, na vigência da terapia antirretroviral prolongada (Brenner *et al.*, 2002) ou em pacientes que não apresentam tratamento prévio (Nájera *et al.*, 1995; Simonetti *et al.*, 2003).

O nível de resistência aos inibidores de RT análogos de nucleosídeo é proporcional ao número de mutações ocorridas na região que codificam para a enzima do HIV-1 (Richman *et al.*, 1991) e, em geral, os efeitos clínicos decorrentes de muitas dessas mutações se sobrepõem. Para os não análogos, uma única mutação é suficiente para conferir resistência aos compostos atualmente utilizados no tratamento antiviral.

As mutações primárias são, geralmente, selecionadas no início do processo de acúmulo de mutações que conferem resistência aos antirretrovirais; são relativamente específicas aos inibidores e podem atuar na suscetibilidade viral ao fármaco.

As mutações secundárias acumulam-se em genomas virais que já apresentem uma ou mais mutações primárias. Algumas mutações secundárias podem apresentar pouco ou não apresentar, individualmente, efeito considerável sobre a resistência viral; entretanto, a seleção pode ocorrer mais pelo fato de poderem estimular a capacidade de replicação viral do que pelo decréscimo de ligação do fármaco às enzimas-alvo.

## Mutações de resistência aos NRTI

Em 2007, Shafer *et al.* propuseram considerações para o desenvolvimento de uma lista de mutações de resistência viral para estimativas epidemiológicas, incluindo mutações que causem ou contribuam para a resistência, que sejam desenvolvidas em indivíduos em tratamento e aplicáveis a todos os subtipos virais do grupo M. Essas mutações foram agrupadas em:

- **Mutações aos análogos de timidina (TAM):** também denominadas mutações de excisão de nucleotídeo, promovem o desbloqueio de cadeias de DNA viral interrompidas por ação dos NRTI, por meio de fosforólise via ATP
- **Mutações aos não análogos de timidina:** referem-se a regimes terapêuticos que incluem abacavir, didanosina ou tenofovir
- **Mutações de resistência a múltiplos NRTI:** ocorrem nos códons 62, 75, 77 e 116, associadas às mutações no códon 151, e conferem elevados níveis de resistência a abacavir, didanosina, estavudina e zidovudina
- **Mutações acessórias:** ocorrem com as TAM e estão associadas a reduções na suscetibilidade a múltiplos NRTI
- **Mutações de hipersuscetibilidade:** várias mutações estão associadas à suscetibilidade aumentada aos NRTI.

## Mutações de resistência aos NNRTI

As mutações de resistência aos NNRTI são encontradas próximo ao sítio hidrofóbico da subunidade p66 de RT e classificam-se em:

- **Mutações de resistência aos NNRTI:** conferem diferentes níveis de resistência a nevirapina, delavirdina e efavirenz, com exceção das mutações P225H, com resistência somente a efavirenz e P236L, com resistência somente a delavirdina
- **Mutações adicionais:** incluem várias mutações incomuns, associadas à terapia com NNRTI e à suscetibilidade reduzida a esses compostos
- **Mutações polimórficas:** apresentam pouco efeito sobre a resistência aos antirretrovirais. A exceção a este grupo é a substituição polimórfica K103R, que ocorre em cerca de 1 a 2% de indivíduos não tratados, reduzindo a suscetibilidade, em 15 vezes, a nevirapina, delavirdina e efavirenz, quando associada à mutação V179D
- **Mutações em posições adicionais:** selecionadas por etravirina, causam redução da suscetibilidade a este fármaco ou a cada um dos NNRTI.

## Mutações de resistência aos IP

Essas mutações afetam, diretamente, o sítio catalítico enzimático (posições 25 a 27), causando resistência pelo decréscimo da capacidade de ligação desses quimioterápicos e classificam-se em quatro categorias:

- Mutações de resistência aos IP
- Mutações adicionais
- Mutações acessórias polimórficas e não polimórficas, nas quais os polimorfismos são definidos como mutações naturais que ocorrem, frequentemente, em vírus não expostos à pressão seletiva dos fármacos e as mutações não polimórficas são aquelas que não ocorrem na ausência de terapia
- Mutações de hipersuscetibilidade, que podem aumentar a suscetibilidade a todos os IP, a um grupo de compostos (p. ex., atazanavir, saquinavir e tipranavir) ou a compostos individuais (p. ex., tipranavir, fosamprenavir).



### Mutações de resistência aos inibidores de fusão

Mutações no gene *env* do HIV-1, que codifica para a glicoproteína 41 (gp41), domínio HR-2, foram relatadas em oito posições conferindo resistência ao enfuvirtide. Mutações acessórias, associadas a outras mutações específicas nas posições 36 a 45, contribuem para uma capacidade melhor de replicação viral.

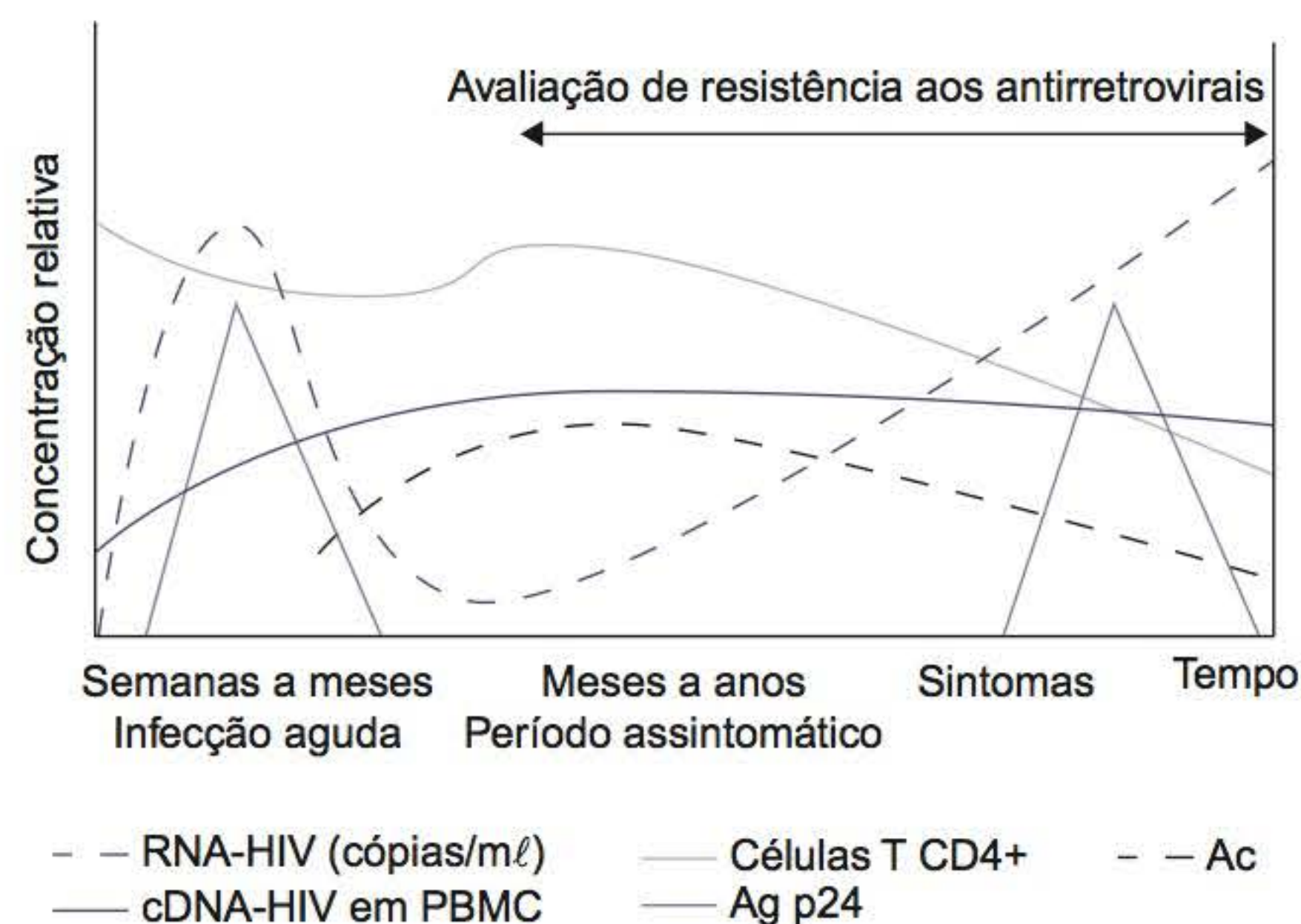
### Mutações de resistência aos inibidores de integrase

Mutações de resistência aos inibidores de integrase (INI), selecionadas em indivíduos em tratamento com raltegravir ou elvitegravir, têm sido caracterizadas para a suscetibilidade *in vitro*.

## ► Diagnóstico laboratorial

### ▪ Infecção pelo HIV e marcadores virais

Na infecção inicial pelo HIV observa-se importante aumento da carga viral e de antígeno p24, posteriormente inibido pela ativação da resposta imune (Figura 7.3). Períodos de incubação, que variam de alguns dias a 3 meses, têm sido descritos, e a soroconversão ocorre entre 1 e 10 semanas após o início da doença (Cooper *et al.*, 1987). Anticorpos contra o HIV-1 podem ser detectados por teste de imunofluorescência em períodos de 2 a 8 dias após o início da infecção (Clark *et al.*, 1991). Testes de radioimunoprecipitação e *Western blot* podem ser reativos em períodos de 2 semanas de doença clínica, enquanto testes imunoenzimáticos tornam-se reativos posteriormente (Gaines *et al.*, 1987), em períodos médios de 31 a 58 dias. A seguir, é estabelecida uma condição de equilíbrio entre vírus e hospedeiro, variável de pessoa a pessoa e que pode ser preditiva de um curso clínico de longa duração. Em adultos, períodos médios anteriores ao desenvolvimento da AIDS têm sido estimados em 10 anos, na ausência de terapia (Rutherford *et al.*, 1990). Nessa fase, indivíduos infectados geralmente apresentam baixos e persistentes níveis de viremia e depleção gradual de linfócitos T CD4+ que, na ausência de tratamento, pode levar a uma grave imunodeficiência e ao aparecimento de infecções oportunistas, neoplasias e morte. No estágio final da doença, são observados novamente níveis elevados da carga viral e antígeno p24.



**Figura 7.3** Marcadores biológicos e imunológicos do HIV-1, associados a infecção e doença.

Testes quantitativos de biologia molecular melhoraram sensivelmente o monitoramento da doença, avaliando não só o prognóstico como também a resposta à terapia antirretroviral. Técnicas de amplificação genômica ou de sinais, empregando as tecnologias *reversed transcriptase-polymerase chain reaction* (rT-PCR), *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) e *branched-DNA* (b-DNA) permitem avaliações quantitativas do RNA viral no plasma, mesmo no início da infecção (Piatec *et al.*, 1993).

A determinação qualitativa do cDNA viral é recomendada, principalmente, para o diagnóstico da infecção pelo HIV em crianças nascidas de mães soropositivas, com idade até 15 meses, nas quais a permanência de anticorpos maternos pode determinar resultados falso-positivos, e também em casos de infecção recente, com períodos inferiores a 2 ou 3 meses, nos quais não tenha havido, ainda, a soroconversão e em casos de indivíduos com resultados de testes sorológicos duvidosos ou indeterminados, observados em pacientes com hepatite alcoólica, anormalidades imunológicas ou neoplasmas, mulheres múltiparas e indivíduos politransfundidos, os quais têm desenvolvido anticorpos contra antígenos HLA classe II, presentes em linhagens de células com replicação do HIV.

Muitas metodologias foram desenvolvidas e aplicadas à utilização rotineira para o estudo de marcadores biológicos e imunológicos, associados a infecção e doença causadas pelo HIV (Figura 7.3). As técnicas são: determinação sorológica de anticorpos circulantes; detecção e quantificação de antígenos virais (Agp24); detecção e quantificação do genoma viral, cDNA ou RNA.

### ▪ Testes imunológicos

Os testes aplicados ao diagnóstico da infecção pelo HIV, pela pesquisa de anticorpos circulantes, podem apresentar diferentes abordagens metodológicas, como os métodos imunoenzimáticos (Enzyme Linked Immunosorbent Assay® [ELISA] e Enzyme Linked Fluorescent Assay® [ELFA]), o método quimioluminescente e outros tipos de testes, como a aglutinação que emprega antígenos ligados a partículas de látex, gelatina ou hemácias, e de revelação direta.

Os imunoenzimáticos, mais comumente utilizados, empregam antígenos adsorvidos em fases sólidas, que podem ser proteínas recombinantes obtidas por engenharia genética, peptídeos quimicamente sintetizados (geralmente gp41 e p24 para o HIV-1 e gp36 para o HIV-2) ou o próprio vírus inativado (lisado viral).

Esses métodos são, preferencialmente, utilizados para rastreamento em bancos de sangue e amostras sorológicas de indivíduos com sintomatologia sugestiva ou assintomáticos e com história de situação de risco. Os testes licenciados e comercializados atualmente apresentam elevada sensibilidade e especificidade, com índices de 98 a 99%, e a possibilidade de automação permite a análise de um grande número de amostras em pequeno intervalo de tempo.

Um teste sorológico, reativo para anti-HIV em uma primeira amostra, deverá ser repetido, com a mesma amostra, por metodologia de diferente procedência. Se for reativo novamente, deve-se considerar o resultado positivo. Recomenda-se a repetição da mesma rotina, em uma segunda coleta, como conduta para confirmar essa positividade em método imunoenzimático e em conjunto com outros testes de confirmação. Os métodos de *Western blot* e imunofluorescência em células fixadas são amplamente utilizados como testes confirmatórios, em função de sua especificidade.



O *Western blot* é um método com elevada sensibilidade e especificidade que permite identificar anticorpos contra os diferentes constituintes do HIV-1. A metodologia do teste utiliza antígenos do vírus, obtido em cultura de linhagem celular ou sinteticamente obtidos, separados em distintas regiões, por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com seu peso molecular. A transferência para uma membrana de nitrocelulose permite a reação entre os antígenos fixados na membrana e os anticorpos, presentes no soro ou plasma de indivíduos infectados. Padrões de positividade podem ser definidos como: (1) reatividade para p24 ou p31 e (2) gp41 ou gp120/gp160, com recomendações de que pelo menos uma das duas, p24 ou gp120/gp160, seja identificada (Centers for Disease Control and Prevention, 1989).

A ausência de reações específicas para os diferentes antígenos do HIV confirma a reação negativa, e padrões que não atendam ao critério de positividade estabelecido são considerados indeterminados. Resultados indeterminados podem ser observados em indivíduos com soroconversão precoce ou em fase avançada da infecção pelo HIV-1, casos de infecção pelo HIV-2 ou por reatividade cruzada com aloanticorpos (gravidez e indivíduos politransfundidos) ou autoanticorpos (neoplasias e doenças autoimunes).

A detecção do antígeno p24 do HIV-1, no sangue periférico, é clinicamente importante por seu valor para o diagnóstico da infecção, previamente ao período de soroconversão. Após a exposição ao HIV, o antígeno p24 está presente, no soro, por períodos que se estendem de poucas semanas a vários meses até o desenvolvimento de anticorpos (Cooper *et al.*, 1987). A formação de complexos antígeno-anticorpo dificulta a detecção dos níveis de antígeno circulante, que pode tornar-se indetectável por meses a anos. A antigenemia é novamente detectada com a evolução do quadro clínico, associada a prognóstico desfavorável e falência imunológica. Métodos para a detecção do antígeno p24, incluindo os de dissociação ácida, consistem em ensaios imunoenzimáticos que utilizam anticorpos monoclonais anti-p24 (Merigan *et al.*, 1989). Testes de quarta geração que detectam simultaneamente AgHIV e anticorpos anti-HIV permitem reduzir para 5 dias o período de janela imunológica (Long, 2011; Pavie *et al.*, 2010).

## ■ Testes de biologia molecular

Métodos de biologia molecular, que permitem a amplificação genômica ou aqueles que amplificam sinais, têm sido amplamente utilizados para detectar e quantificar cDNA e RNA do HIV-1, a partir de sangue total e soro ou plasma (Piatec *et al.*, 1993).

### cDNA viral | Determinação qualitativa

A determinação qualitativa do cDNA viral ou DNA proviral é feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Ela se aplica à confirmação de resultados de testes imunoenzimáticos reativos e *Western blot* indeterminados, que requerem avaliações clínicas e acompanhamento laboratorial, com a coleta de novas amostras. O método permite a amplificação exponencial de sequências do ácido nucleico, com elevadas especificidade e sensibilidade (Rozera *et al.*, 2010).

### RNA viral | Determinação quantitativa (carga viral)

A carga viral traduz o número de partículas virais no sangue periférico e, por meio de metodologias de amplificação do ácido nucleico ou sondas marcadas, pode ser estimada pela quantificação direta do RNA viral no plasma de pacien-

tes infectados. A avaliação da carga viral permite estabelecer o estágio da infecção viral e o risco de evolução à AIDS, indicar o início da terapia antirretroviral e monitorar a resposta à terapia, e pode, com ressalvas, ser utilizado como teste confirmatório.

Diferentes métodos moleculares estão disponíveis comercialmente para a quantificação do ácido nucleico viral, com variados graus de sensibilidade. Cada um deles utiliza diferentes estratégias para as etapas requeridas para o preparo da amostra, amplificação e detecção, alcançando limites bastante baixos de quantificação, equivalentes a 50 a 80 cópias de RNA por mililitro de plasma.

Os métodos de escolha, tais como Amplicor HIV-1 Monitor, NucliSens HIV-1 QT assay, Versant HIV-1 RNA assay (bDNA) e LCx HIV RNA Quantitative Assay, apresentam constantes atualizações que levam ao desenvolvimento de tecnologias mais sensíveis e específicas.

### Amplificação e detecção em tempo real (*real-time PCR*)

Um importante avanço na determinação da carga viral para HIV-1 foi a implementação da detecção, em tempo real, do produto acumulado durante a fase exponencial da amplificação por PCR ou NASBA, em contraposição aos ensaios tradicionais com titulação final (Heid *et al.*, 1996). O método permite reduzir o número de etapas, manipular a amostra e prever o risco de contaminação, mantendo a sensibilidade e especificidade dos ensaios de amplificação tradicionais, mas com uma variação linear muito mais expandida, da ordem de  $5 \log_{10}$ .

Estudos comparativos do desempenho dos diferentes produtos são publicados com frequência, o que permite uma análise bastante apropriada (Bourlet *et al.*, 2011; Ssebugenyi *et al.*, 2011).

Os métodos comercialmente disponíveis são:

- *AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test*: tem como alvo a sequência conservada do gene *gag* do HIV-1, amplificada de forma seletiva na presença de um RNA como padrão interno, dUTP e AmpErase. A reação *real-time PCR* (RT-PCR) se processa pela adição de enzima recombinante com atividades de transcrição reversa e DNA polimerase, sondas marcadas com fluoróforos e *quencher* e enzima com atividade exonuclease (Meng *et al.*, 2001). A faixa de detecção do teste situa-se entre 40 e  $1 \times 10^7$  cópias por mililitro de plasma
- *NucliSens EasyQ HIV-1 (bioMérieux)*: a detecção em tempo real dos amplicons ocorre durante a fase exponencial da reação NASBA, por meio de sondas moleculares marcadas com fluoróforos que diferenciam entre a sequência-alvo específica e amplicons calibradores (Tyagi *et al.*, 1998). De acordo com estudos desenvolvidos por de Mendoza *et al.* (2005), o ensaio apresenta especificidade de 99,3% com variação linear entre 50 e  $3 \times 10^6$  UI/mL
- *RealTime HIV-1 Assay (Abbott Laboratories)*: a sequência-alvo é o gene *pol* do HIV-1. É utilizada, na reação, uma única sonda que apresenta cadeias parcialmente duplas, marcadas com fluoróforo (*repórter*) na terminação 5' e *quencher* na terminação 3' da cadeia complementar, menor. Na presença da sequência-alvo, ocorre a ligação preferencial da sonda *repórter*, que fluoresce sob a liberação da sonda *quencher*. As características do ensaio indicam variação linear de  $5 \log_{10}$ , especificidade de 100%, probabilidade de 95% de detecção de amostras com carga viral equivalente a 25 cópias por mililitro e reconhecimento de subtipos virais dos grupos M, N, e O (Bourlet *et al.*, 2011; Ssebugenyi *et al.*, 2011).



## ■ Genotipagem do HIV-1

O mecanismo de resistência do HIV-1 aos fármacos antirretrovirais é o principal obstáculo ao sucesso da terapia e decorre, principalmente, do desenvolvimento de mutações no genoma viral, em regiões que codificam para as enzimas envolvidas no processo de replicação viral; em consequência, a função enzimática não é afetada por inibidores virais e a replicação se processa normalmente.

Testes para a avaliação da resistência viral podem ser úteis, esclarecendo aspectos da interação fármaco-hospedeiro e, quando associados aos valores de carga viral e células T CD4+, podem auxiliar na determinação de alterações de esquemas terapêuticos ou na introdução do regime antiviral.

Vários métodos laboratoriais foram padronizados e aplicados à detecção de mutações associadas à resistência antirretroviral, incluindo-se técnicas de clivagem por RNase (López-Galíndez *et al.*, 1991), sistemas de hibridização RNA/RNA (Japour *et al.*, 1991), reação em cadeia da polimerase (Richmann *et al.*, 1991), ensaio de sondas lineares (Stuyver *et al.*, 1997) e a genotipagem por sequenciamento do cDNA viral (Johnston-Dow *et al.*, 1998), que é o método de escolha para a determinação de mutações em genes específicos do genoma viral, indicando níveis de resistência aos antirretrovirais. Os resultados obtidos por todas as metodologias devem ser cuidadosamente interpretados em associação a outros parâmetros, tais como medicação prévia, informações clínicas e dados laboratoriais.

## ■ Fenotipagem

A suscetibilidade viral aos fármacos pode, alternativamente, ser avaliada por testes de resistência fenotípica, que consistem na quantificação da sensibilidade aos antirretrovirais. Inóculos virais, identificados como cepas selvagens e mutantes, são mantidos em culturas celulares, sob a pressão seletiva de fármacos antivirais, em concentrações crescentes, expressas em IC<sub>50</sub> (índice que indica a concentração mínima do fármaco requerida para inibir 50% da replicação viral). A supressão da produção viral *in vitro* é determinada para os inóculos virais em comparação aos valores *cut-off* estabelecidos, decisivos na interpretação dos resultados. Esse método de avaliação da resistência viral apresenta algumas desvantagens: é um procedimento moroso e de custo elevado e, para alguns fármacos, não estão estabelecidos os valores de *cut-off* clínico.

## ► Bibliografia

- Aiken C, Konner J, Landau NR *et al.* Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994; 76:853-64.
- Arasteh K, Des Jarlais DC. Injecting drug use, HIV, and what to do about it. *Lancet* 2008; 372:1709-10.
- Arthur LO, Bess JW, Sowder RC *et al.* Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992; 258:1935-8.
- Azzoni L, Rutstein RM, Chehimi J *et al.* Dendritic and natural killer cell subsets associated with stable or declining CD4+ cell counts in treated HIV-1 infected children. *J Infect Dis* 2005; 191:1451-9.
- Baba M, Shigeta S, Yuasa S *et al.* Preclinical evaluation of MKC-442, a highly potent and specific inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:688-92.
- Baba M, Tanaka H, De Clercq E *et al.* Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclovir derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165:1375-81.
- Banda NK, Bernier J, Kurahara DK *et al.* Cross-linking CD4 by HIV gp 120 primers T cells for activation induced apoptosis. *J Exp Med* 1992; 176:1099-1106.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-71.
- Barth OM. Contrastação negativa. In: Souza W (ed.). *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. 3ª edição. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Rio de Janeiro, 2011.
- Baur AS, Sawai ET, Dazin P *et al.* HIV-1 nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* 1994; 1:373-84.
- Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L *et al.* HIV-1 load comparison using four commercial real-time assays. *JCM* 2011; 1;49:292-297.
- Brenner BG, Routy JP, Petrella M *et al.* Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 2002; 76:1753-61.
- Brillant J, Klumpp K, Swallow S *et al.* *In vitro* resistance development for a second-generation NNRTI: TMC125. *Antivir Ther* 2004; 9:S20.
- Brown PO. Integration. In: Coffin JM (ed.). *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997; p. 161-203.
- Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA *et al.* Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994; 8:1123-8.
- Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP *et al.* Quiescent lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991; 254:423-7.
- Burns DPW, Desrosiers RC. Envelope sequence variation, neutralizing antibodies and primate lentivirus persistence. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 188:185-219.
- Caride E, Brindeiro R, Hertogs K *et al.* Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2001; 275:107-15.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. The Global HIV/AIDS pandemic, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55:841-4.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report, 2007. Vol 19. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC, 2009.
- Chakraborty R, Morel AS, Sutton JK *et al.* Correlates of delayed disease progression in HIV-1-infected Kenyan children. *J Immunol* 2005; 174:8191-9.
- Clark SJ, Saag MS, Decker WD. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:954-60.
- Clements JE, Wong-Staal F. Molecular biology of lentiviruses. *Semin Virol* 1992; 3:137-46.
- Collins KL, Chen BK, Walker BD *et al.* HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391:397-401.
- Cooper DA, Imrie AA, Penny R. Antibody response to human immunodeficiency virus after primary infection. *J Infect Dis* 1987; 155:1113-8.
- D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA *et al.* Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med* 1996; 124:1019-30.
- Darke PL, Nutt RF, Brady SF *et al.* HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156:297-303.
- De Clercq E. Non nucleoside reverse transcriptase inhibitors: An overview in insights in HIV disease management. *Meniscus Health Care Commun* 1997; 6:2-9.
- De Clercq E, Field HJ. Antiviral chemistry and chemotherapy's current antiviral agents FactFile (2nd edition): retroviruses and hepadnaviruses. *Antivir Chem Chemother* 2008; 19:75-105.
- de Mendoza C, Koppelman M, Montes B *et al.* Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQT HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *J Virol Methods* 2005; 127:54-9.
- Denissen JF, Grabowski BA, Johnson MK *et al.* Metabolism and disposition of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* 1997; 25:489-501.
- De Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM *et al.* Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:1-13.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y *et al.* A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the  $\beta$ -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85:1149-58.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272:872-7.
- Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998; 338:1281-92.
- Frederick T, Mascola L, Eller A *et al.* Progression of human immunodeficiency virus disease among infants and children infected perinatally with human immunodeficiency virus or through neonatal blood transfusion. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:1091-7.



- Freed EO. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends in Microbiology* 2004; 12:170-7.
- Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH *et al.* Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8333-7.
- Gaines H, Sonnerborg A, Czajkowski J. Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1987; 1:1249-53.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 4:500-3.
- Gao F, Morrison SG, Robertson DL *et al.* Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J Virol* 1996; 70:1651-67.
- Gao F, Vidal N, Li Y *et al.* Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retrovir* 2001; 17:675-88.
- Gao Q, Yue L, Robertson DL. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 1994; 68:7433-47.
- Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991; 5:617-38.
- Gill B, Okie S. China and HIV – a window of opportunity. *N Engl J Med* 2007; 356:1801-5.
- Goff S. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds). *Filds Virology*. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; p. 1871-1940.
- Gulick RM, Mellors JW, Havlir D *et al.* Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997; 337:734-9.
- Gutler L, Eberle J, von Brunn A *et al.* A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MPV 5180) from Cameroon. *J Virol* 1994; 68:1581-5.
- Hanna GJ, Hirsch MS. Antiretroviral therapy of human immunodeficiency virus Infection. In: Mandell GL, Dolin JE, Bennett K (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease* Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; p. 1479-1500.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-94.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD *et al.* Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20:13-23.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-6.
- Ho DD, Tarsem M, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989; 321:1621-5.
- Höglund S, Ofverstedt L-G, Nilsson A *et al.* Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:1-7.
- Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K *et al.* Genetic and phylogenetic analysis of *env* subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994; 10:877-9.
- Japour AJ, Chatis PA, Eigenrauch HA. Detection of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates with reduced sensitivity to zidovudine and dideoxyinosine by RNA-RNA hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3092-6.
- Johnston-Dow L, Conrad M, Kolenberger R. Development of an automated DNA sequencing-based method for the genotyping of HIV drug resistance mutations. Fourth International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, 1998; Glasgow, Scotland.
- Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G *et al.* Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:654-60.
- Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD *et al.* The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990; 64:621-9.
- Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB *et al.* Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332:228-32.
- Kroeger Smith MB, Rouzer CA, Taneyhill LA *et al.* Molecular modeling studies of HIV-1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitors: Total energy of complexation as a predictor of drug placement and activity. *Protein Sci* 1995; 4:2203-22.
- Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M *et al.* A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17:691-8.
- Lefrère J-J, Morand-Joubert L, Mariotti M *et al.* Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997; 90:1133-40.
- Leigh-Brown AJ. Sequence variability of human immunodeficiency viruses: pattern and process in viral evolution. *AIDS* 1991; (supp. 5s):35-42.
- Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR *et al.* Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 1986; 323:725-8.
- Liu SL, Schacker T, Musey L *et al.* Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol* 1997; 71:4284-95.
- Long EF. HIV screening via fourth-generation immunoassay or nucleic acid amplification test in the United States: a cost-effectiveness analysis. *PLoS ONE* 2011; 6:e27625. Disponível em: <http://www.plosone.org>.
- López-Galíndez C, Rojas JM, Nájera R. Characterization of genetic variation and 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistance mutations of human immunodeficiency virus by the RNase A mismatch cleavage method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4280-4.
- Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M *et al.* Phylogenetic analysis of *gag* genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993; 7:769-80.
- Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B *et al.* Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by vif. *Cell* 2003; 114:21-31.
- Mathers BM, Degenhardt L, Phillips B *et al.* Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review. *Lancet* 2008; 372:1733-45.
- McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* 2006; 78:S7-S12.
- Meng Q, Wong C, Rangachari A *et al.* Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2937-45.
- Merigan TC, Skowron G, Bozzette S. Circulating p24 antigen levels and response to dideoxycytidine in human immunodeficiency virus (HIV) infections. *Ann Intern Med* 1989; 110:189-94.
- Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:466-74.
- Mofenson L. Challenges in pediatric and adolescent HIV care. Program and abstracts of the 15<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, Massachusetts; February 3-6, 2008. Abstract 47LB.
- Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG *et al.* High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the City of Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 18:488-94.
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG *et al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:569-76.
- Munn R, Marx PA, Yamamoto JK, Gardner MB. Ultrastructural comparison of the retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes. *Lab Invest* 1985; 53:194-9.
- Muthumani K, Choo AY, Zong WX *et al.* The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol* 2006; 8:170-9.
- Myers G, Pavlakis GN. Evolutionary potential of complex retroviruses. In: Levy JA (ed.). *The Retroviridae*. New York: Plenum Press, 1992; p. 51-105.
- Nájera I, Holguín A, Quiñones-Mateu ME *et al.* Pol gene quasiespecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol* 1995; 69:23-31.
- Niehues T, Lyall H. Antiretroviral therapy in children. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS (ed.). *HIV Medicine* 2007. Paris: Flying Publisher, 2007; p. 369-86. Disponível em <http://www.HIVMedicine.com>.
- Osmanov S, Pattou C, Walker N *et al.* Network for HIV isolation and characterization. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:184-90.
- Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338:853-60.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355-8.
- Parslow TG. Post-transcriptional regulation of human retroviral gene expression. In: Cullen BR (ed.). *Human Retroviruses*. Oxford: IRL Press, 1993; p. 101-36.
- Pavie J, Rachline A, Loze B *et al.* Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting. *PLoS ONE* 2010; 5:e11581. Disponível em: <http://www.plosone.org>.
- Peterlin BM, Adams M, Alonso A. Tat trans-activator. In: Cullen BR, editor. *Human Retroviruses*. Oxford: IRL Press, 1993; p. 75-100.
- Piatec M, Saag MS, Yang LC. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259:1749-54.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009; 15:871.
- Richman DD, Guatelli JC, Grimes J *et al.* Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 164:1075-81.



- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242:1171-3.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288:55-6.
- Rozera G, Abbate I, Bruselles A *et al.* Comparison of real-time PCR methods for measurement of HIV-1 proviral DNA. *J Virol Methods* 2010 Mar; 164(1-2):135-8.
- Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 infection. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS (ed.). *HIV Medicine* 2007. Paris: Flying Publisher, 2007; p. 59-86. Disponível em: <http://www.HIVMedicine.com>.
- Rutherford GW, Lifson AR, Hessel NA. Course of HIV infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow-up study. *BMJ* 1990; 301:1183-8.
- Saag MS, Emmini EA, Laskin OL *et al.* A short-term clinical evaluation of L-697,661, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. L-697,661 Working Group. *N Engl J Med* 1993; 329:1065-72.
- Schinazi RF. Competitive inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Perspect Drug Dev Design* 1993; 1:151-80.
- Schröder AR, Shinn P, Chen H *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002; 110:521-9.
- Scott-Algara D, Buseyne F, Porrot F *et al.* Not all tetramer binding CD8+ T cells can produce cytokines and chemokines involved in the effector functions of virus-specific CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infected children. *J Clin Immunol* 2005; 25:57-67.
- Shafer RW, Rhee S-Y, Pillay D *et al.* HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 2007; 21:215-23.
- Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P *et al.* Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1: Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336:1337-42.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. *Nature* 2002; 418:646-50.
- Simon F, Maucière P, Roques P *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998; 4:1032-7.
- Simonetti SRR, Schatzmayr HG, Simonetti JP. Human Immunodeficiency Virus type 1: drug resistance in treated and untreated Brazilian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:831-7.
- Soares EA, Martinez AM, Souza TM *et al.* HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19:81-6.
- Ssebugenyi I, Kizza A, Mpoza B *et al.* Comparison of the Abbott m2000 HIV-1 Real-Time and Roche AMPLICOR Monitor v1.5 HIV-1 assays on plasma specimens from Rakai, Uganda. *Int J STD AIDS* 2011 Jul; 22(7):373-5.
- Strebel K, Daugherty D, Clouse K *et al.* The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1987; 328:728-30.
- Stuyver L, Wyseur A, Rombout A. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:284-91.
- Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A *et al.* Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol* 1994; 243:369-87.
- Telesnitsky A, Goff SP. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In: Coffin JM (ed.). *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997; p. 121-60.
- Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6900-3.
- The European Collaborative Study. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatrics* 1994; 94:815-9.
- Tiemessen CT, Kuhn L. Immune pathogenesis of pediatric HIV-1 infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 2006; 3:13-9.
- Triques K, Bourgeois A, Vidal N *et al.* Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV-1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV-1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retrovir* 2000; 16:139-51.
- Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* 1998; 16:49-53.
- UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic, 2010. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization, December 2010.
- van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD *et al.* Selective decrease in circulating V alpha 24+ V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol* 2002; 168:1490-5.
- Wain-Hobson S. Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies *in vivo* and *ex vivo*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 176:181-93.
- Wang FX, Kimura T, Nihihara K *et al.* Emergence of autologous neutralization-resistant variants from preexisting human immunodeficiency virus (HIV) quasi species during virus rebound in HIV type 1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002; 185:608-17.
- Wong-Staal F. HIVs and their replication. In: Fields BN, Knipe DM (eds.). *Fundamental Virology*. New York: Raven Press, 1991.
- Zhang H, Dornadula G, Wu Y *et al.* Kinetic analyses of intravirion reverse transcription in the blood plasma of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: Direct assessment of resistance to reverse transcriptase inhibitors *in vivo*. *J Virol* 1996; 70:628-34.



## Capítulo 8

---

# Infecção por HPV

*José Eduardo Levi*

- Introdução, 114
- Diagnóstico laboratorial, 116
- Referências bibliográficas, 119



## ► Introdução

### ▪ Histórico

Nos últimos 20 anos muitas mudanças conceituais ocorreram na área de estudo dos papilomavírus humanos (HPV), bem como na sua relação com câncer de colo de útero e lesões precursoras do mesmo: da clonagem do primeiro HPV humano em 1980 por Lutz Gissman e Harald zur Hausen,<sup>1</sup> passando pelos estudos na década de 1990, utilizando métodos de biologia molecular que revelaram de maneira incontestável o papel causal de alguns tipos de HPV no câncer cervical,<sup>2</sup> sendo a partir de então denominados “oncogênicos”. Esses primeiros anos do novo milênio testemunharam a aplicação rotineira de testes moleculares para HPV no manejo de pacientes com lesões cervicais; o aparecimento de vacinas preventivas altamente eficazes e o merecido Prêmio Nobel de Medicina a Harald zur Hausen em 2008. Reconhecidamente, para nosso orgulho, esse é um campo em que pesquisadores brasileiros deram enorme contribuição, com pesquisas desenvolvidas no país.

### ▪ Classificação e nomenclatura dos papilomavírus

Os papilomavírus são pequenos vírus de DNA com um genoma de cerca de 8.000 pares de bases. Todos os genes estão contidos na mesma fita de DNA, sendo que os genes de

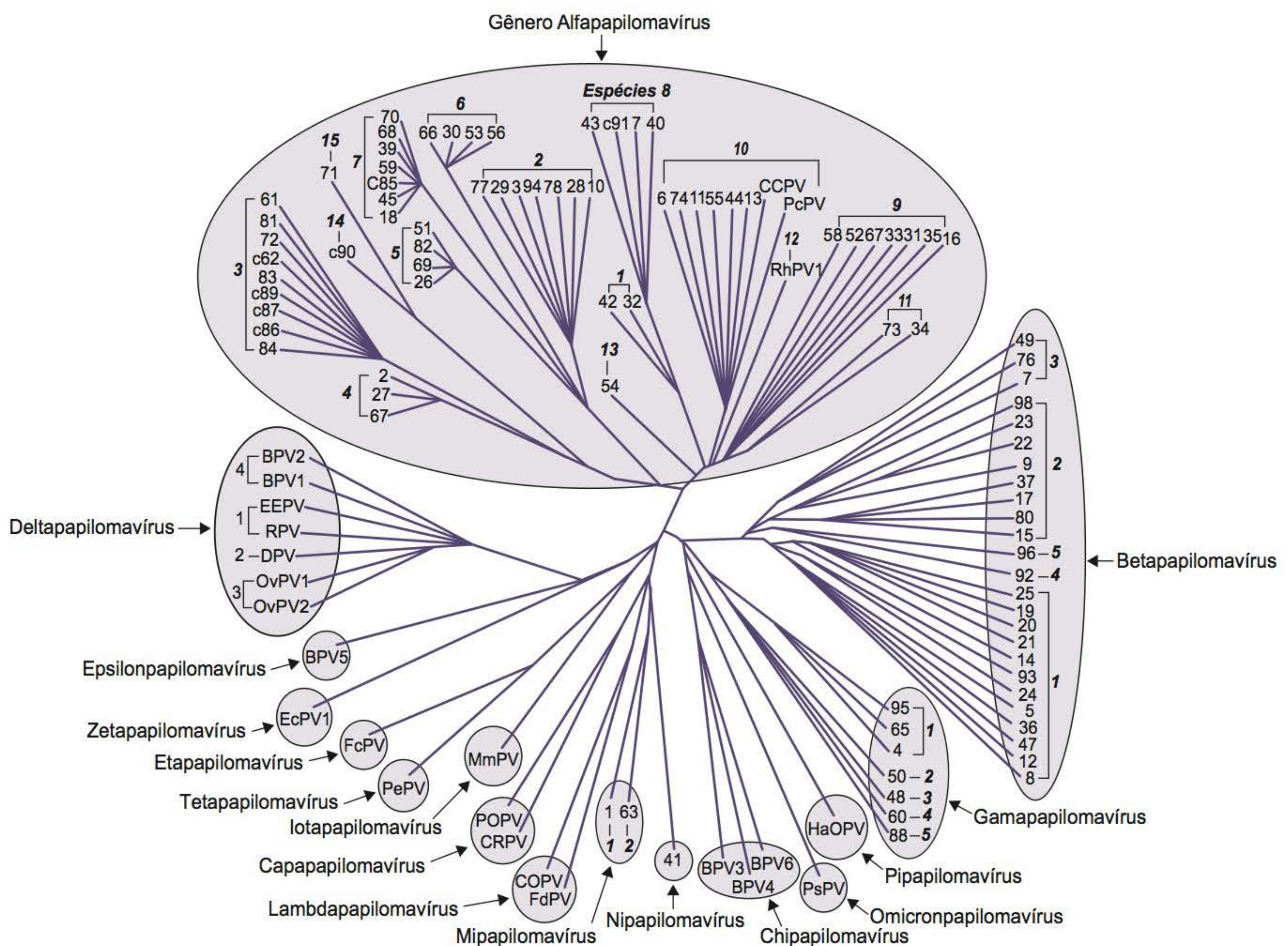
expressão precoce são denominados E (*early*) seguidos de um número, reconhecendo-se E1-E7, e os tardios codificam as proteínas do capsídeo, sendo denominados L1 e L2 (*late*). Os genes E1 e E2 são responsáveis pelo controle da transcrição e replicação viral, enquanto E5, E6 e E7 são os oncogenes virais que interferem nas proteínas do hospedeiro e acarretam replicação celular acelerada e imortalização dos queratinócitos.

Todas as famílias de mamíferos estudadas apresentam infecção por um papilomavírus espécie-específico, não havendo transmissão interespecíficas. Assim, são reconhecidos e classificados os papilomavírus bovinos (BPV), os caninos (CPV) e os murinos (MPV), entre outros. Até mesmo répteis como tartarugas e jacarés e também papagaios apresentam verrugas causadas por seus respectivos papilomavírus.

Uma classificação taxonômica formal dos papilomavírus foi criada e atualmente eles estão agrupados na família Papillomaviridae. Dentro dessa família são reconhecidos gêneros denominados por letras do alfabeto grego, como alfapapilomavírus, betapapilomavírus etc., conforme a Figura 8.1.

Nos humanos, nos quais foram e são mais intensamente estudados, os HPV podem ser divididos, pelo aspecto clínico, em três grupos:

- HPV associados a verrugas cutâneas (gamapapilomavírus)
- HPV associados à mucosa anogenital (alfapapilomavírus)



**Figura 8.1** Árvore filogenética dos papilomavírus<sup>3</sup> com 118 tipos e sua classificação, com base na sequência do gene L1.



- HPV associados a lesões cutâneas de portadores de epidermodisplasia verruciforme, uma doença rara de base hereditária (betapapilomavírus).

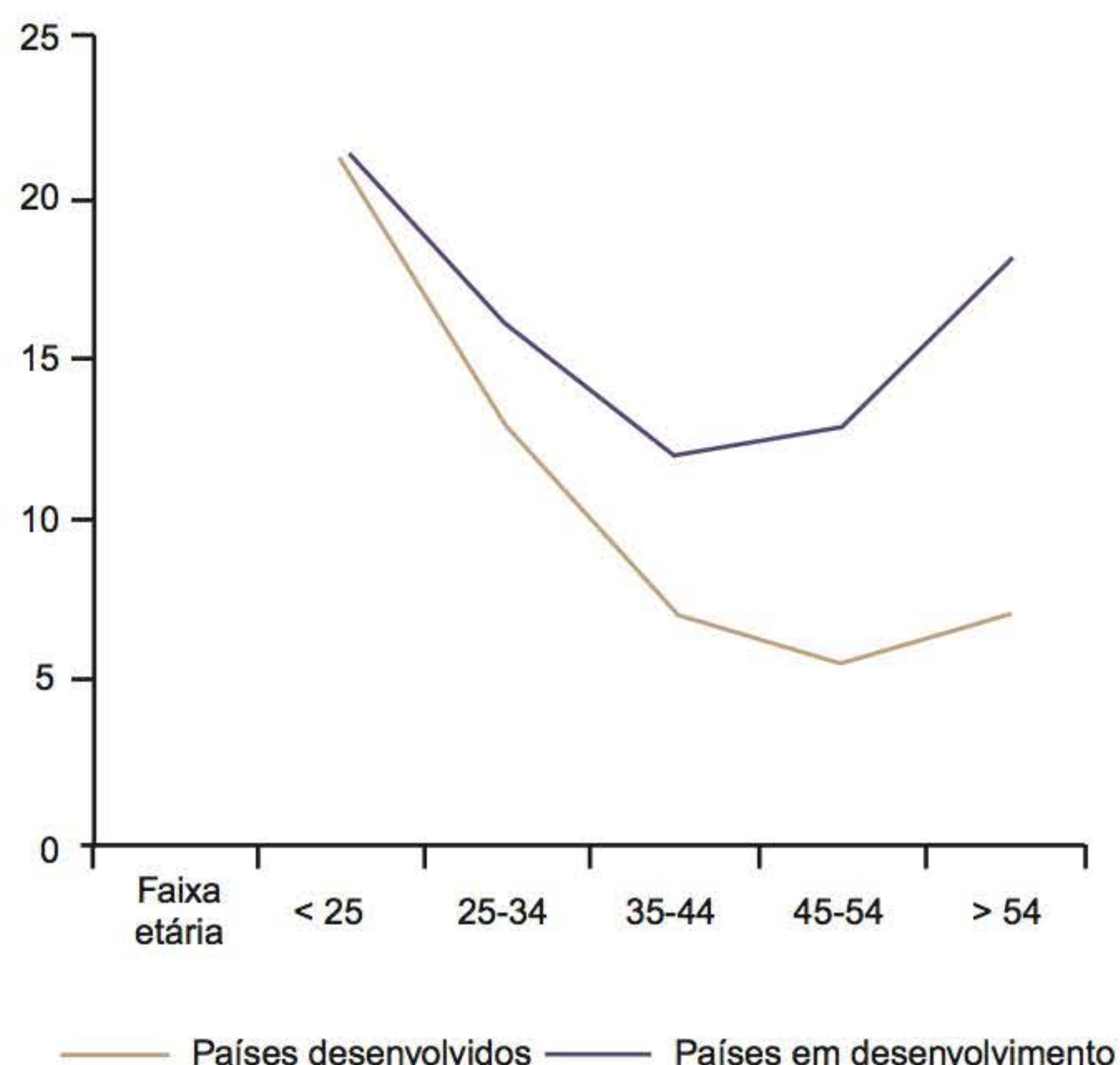
Todos os tipos de HPV de importância para a etiologia do câncer cervical em humanos estão contidos no gênero dos alfafapilomavírus, em que se destacam os HPV 16 e 18, responsáveis por cerca de 70% de todos os tumores dessa localização anatômica no mundo. Entre os HPV que infectam a mucosa anogenital a principal distinção a ser feita se refere ao risco que a infecção por determinado tipo confere para desenvolvimento de neoplasia no portador. Assim, existem os HPV considerados de alto risco (HPV 16 e 18, já apontados, além de 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59 e 66), os de baixo risco (HPV 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81) e os de risco intermediário ou desconhecido (HPV 34, 57, 83 e outros). A classificação desses tipos virais nos respectivos grupos de risco decorre de informações de cunho epidemiológico<sup>4</sup> (prevalência do DNA deste tipo de HPV em tumores × prevalência na população-controle), dados *in vitro*, como a capacidade de imortalização de cultura primária de queratinócitos, produção de tumores em roedores e também por proximidade filogenética.

### ▪ Epidemiologia do câncer cervical e lesões precursoras

A relação entre o câncer cervical e a atividade sexual foi percebida desde os primórdios da medicina. O fato de que esta doença não acometia freiras e virgens, sendo frequente entre prostitutas, sugeria a participação de algum agente sexualmente transmissível em sua etiologia. Por alguns anos a hipótese dos herpes-vírus foi investigada, porém nunca foi comprovada. Na década de 1970, Harald zur Hausen lançou a ideia dos HPV como agentes causais dessa neoplasia. Na década de 1980, alguns estudos epidemiológicos não conseguiram comprovar essa hipótese, persistindo um conflito entre os dados *in vitro* e aqueles obtidos com amostras humanas. Apenas com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) é que a correlação HPV-câncer cervical foi demonstrada de maneira indubitável, atribuindo-se os insucessos pregressos ao diagnóstico de baixa sensibilidade e especificidade dos HPV pelos métodos adotados até então.<sup>5</sup>

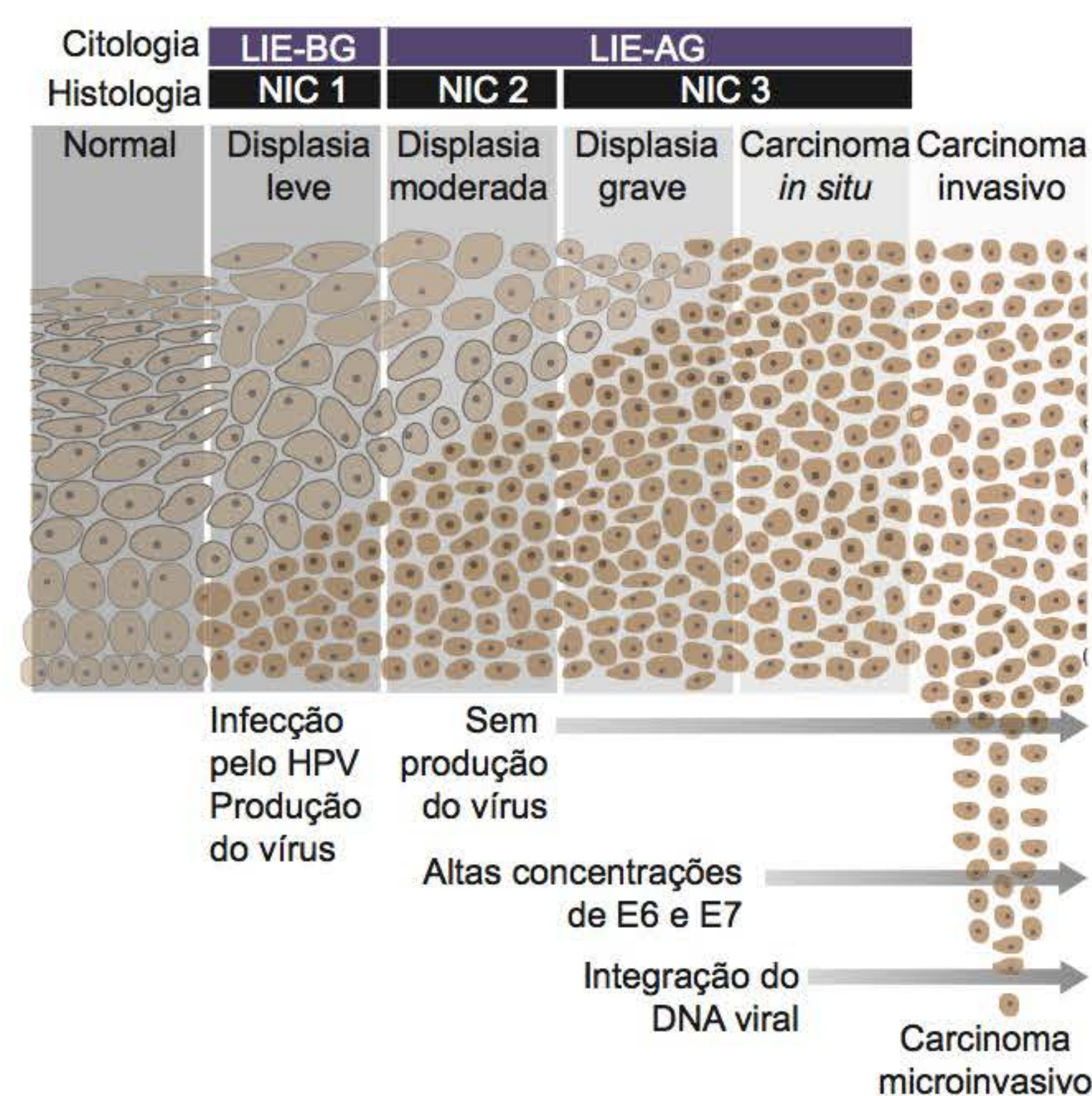
Estudos com acompanhamento de inúmeras coortes de mulheres acompanhadas por muitos anos possibilitaram a elucidação da história natural da infecção pelo HPV e das lesões por ele causadas. Hoje sabemos que a infecção pelo HPV ocorre com o início da atividade sexual e o pico da infecção ocorre justamente na faixa etária com maior atividade sexual, em que se encontra uma prevalência de 10-30% nas mulheres entre 15 e 30 anos de idade. Essa prevalência vai diminuindo até valores inferiores a 5% nas mulheres acima de 55 anos. Curiosamente, algumas localidades geográficas, como a Colômbia e o México, apresentam um segundo pico nesta faixa etária acima dos 55 anos de idade (Figura 8.2). Se levada em consideração a prevalência acumulada, ou seja, o número de mulheres que se infectou pelo HPV em algum momento da vida, verifica-se que esta supera os 50%, sendo, portanto, a infecção por este vírus algo extremamente comum na população em geral.

Estes mesmos estudos demonstraram que, entre as infectadas pelo HPV, estavam sob risco de vir a desenvolver lesões pré-malignas e malignas aquelas que apresentavam persistência do DNA viral por duas análises separadas no tempo, e obrigatoriamente do mesmo tipo de HPV. Verifica-se que a infecção persistente leva ao aparecimento das lesões denominadas intraepiteliais escamosas (LIE). As LIE-BG (baixo grau)



**Figura 8.2** Prevalência do HPV-DNA, ajustada pela distribuição etária populacional, em mulheres com citologia normal (países desenvolvidos e em desenvolvimento).<sup>6</sup>

podem ocorrer já como a manifestação de uma primeira infecção por HPV, porém essas lesões regredem e desaparecem na grande maioria das portadoras. Como mencionado, a persistência do DNA de HPV de alto risco é que causa a evolução de uma LIE-BG para LIE-AG (alto grau), em que há um gradiente de malignidade iniciando-se com a neoplasia intraepitelial cervical (NIC 1 e NIC 2) até a NIC 3/carcinoma *in situ* e por último o carcinoma invasivo (Figura 8.3).



**Figura 8.3** Esquema de um epitélio de mucosa cervical com o gradiente biológico das transformações induzidas por HPV e as classificações citológicas e histológicas. LIE-BG = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIE-AG = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; NIC = neoplasia intraepitelial cervical.<sup>8</sup>



Uma vez que a média da idade de iniciação sexual ocorre entre 15 e 18 anos e a maior incidência do câncer cervical invasivo acontece, no Brasil, na faixa dos 55 a 60 anos, deduz-se que esta doença é de evolução lenta, possibilitando sua prevenção por meio de exames periódicos, tais como o teste de citologia esfoliativa. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta que em 2012 o número de casos novos de câncer do colo de útero esperado será de 17.540, com um risco estimado de 18 casos por 100.000 mulheres.<sup>7</sup>

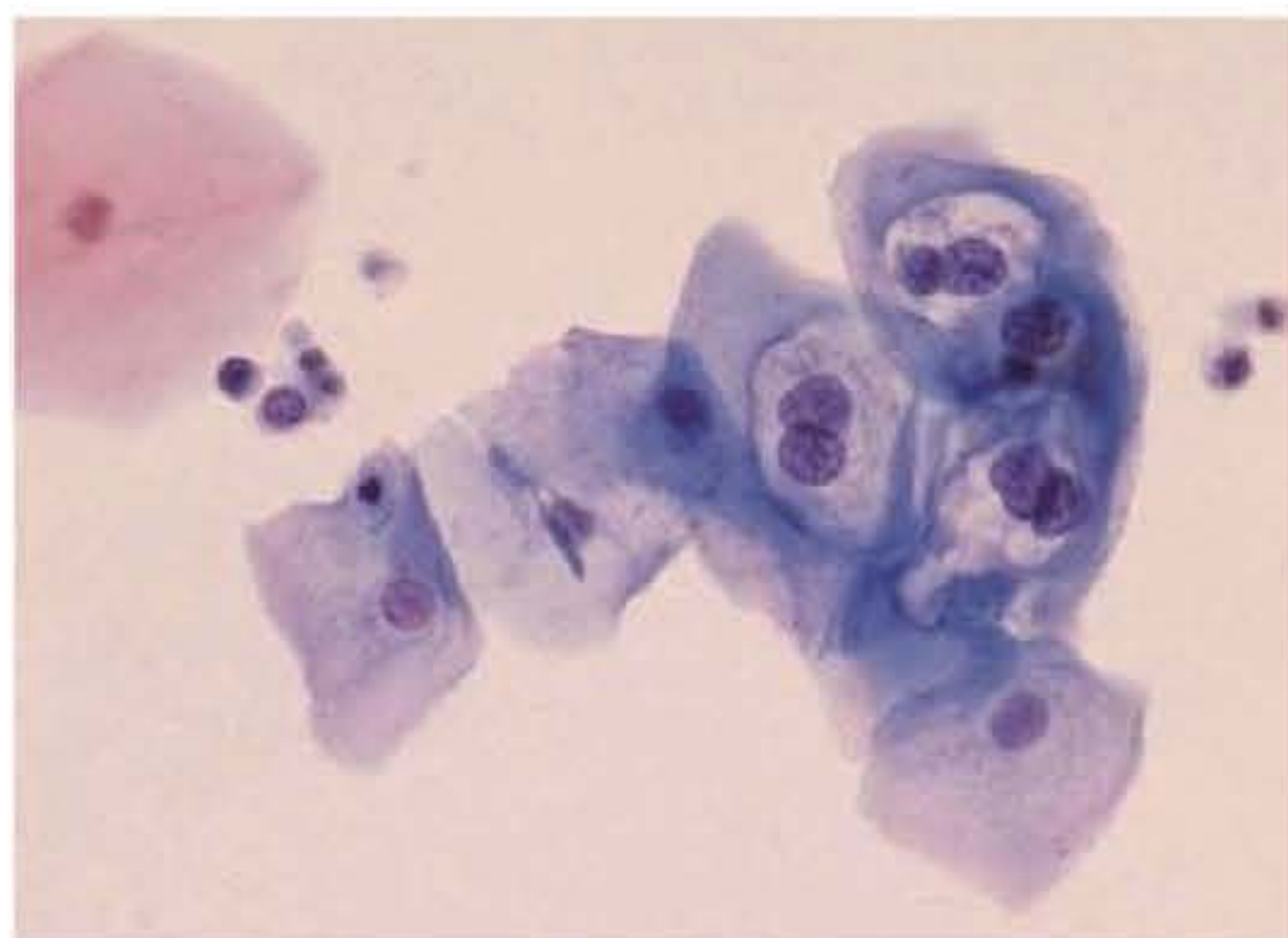
## ► Diagnóstico laboratorial

### ▪ Teste citológico

O teste citológico para o câncer de colo de útero é uma das mais bem-sucedidas intervenções diagnósticas da história da medicina, levando à queda vertiginosa nos índices dessa doença nos países que implantaram programas de citologia com boa adesão pela população. Primeiramente descrito por Georges Papanicolaou, cujo nome até hoje é utilizado como sinônimo do exame de citologia esfoliativa, o teste consiste na coleta de células esfoliadas da mucosa uterina, particularmente da cérvix, com um instrumento tipo espátula, escova ou cotonete, e realização de um esfregaço sobre uma lâmina, que será corada e analisada ao microscópio, buscando a detecção de células com características de malignidade. Este teste foi sendo aprimorado ao longo dos anos, seus critérios mais bem definidos e o modo de relatar os achados padronizado, de maneira a possibilitar a realização do exame em locais diferentes com os mesmos resultados. Ainda assim, é um exame subjetivo e dependente da acurácia do observador, razão pela qual existem enormes variações quanto ao percentual de falso-positivos e negativos deste teste em diferentes laboratórios.

Deve ser ressaltado que o exame citológico visa à detecção de células tumorais, não do HPV. Ainda hoje é comum relatar no laudo citológico “HPV” ou “sugestivo de HPV”. Para isso, o observador vale-se de algumas características morfológicas celulares tidas como patognomônicas da infecção pelo HPV, primordialmente a “coilocitose”, que é o halo perinuclear (Figura 8.4). No entanto, cabe salientar que o achado do coilocito tem uma fraca correlação com a identificação molecular da presença do DNA de HPV, não devendo ser de fato valorizado; portanto, o exame citológico não se presta à detecção de HPV.

A citologia esfoliativa vem sendo modificada de maneira a tornar o exame mais preciso. O uso de meios chamados de



**Figura 8.4** Células escamosas com binucleação e halo perinuclear (coilocito), coradas pelo método de citologia líquida ThinPrep®.

“citologia líquida” possibilita a realização de uma lâmina com melhor visualização das células em monocamada, aumentando a sensibilidade para a detecção de alterações displásicas e diminuindo o número de lâminas de significado indeterminado. Também nessa direção, empresas têm pesquisado o uso de inteligência artificial, ou seja, a leitura da lâmina sendo feita por um computador que seleciona aquelas com alteração para serem então revistas por um citopatologista.

### ▪ Testes moleculares

Em contraste com testes citológicos, exames moleculares que detectam o DNA dos HPV são obviamente específicos para este agente, e são esses resultados que devem ser usados na avaliação de prevalências de infecção por HPV. Com a comprovação do papel etiológico de alguns tipos de HPV, notadamente os HPV tipos 16 e 18, na gênese do carcinoma cervical, pesquisadores passaram a avaliar se a detecção do vírus por esses métodos poderia ser utilizada na prevenção, tal qual um exame citológico, ou mesmo no manejo da paciente, conforme discutido a seguir. No entanto, o uso dos testes moleculares de HPV para a detecção de neoplasia fazem um raciocínio de inferência; se a paciente tem HPV de alto risco é provável que tenha lesão ou poderá vir a ter; se ela não tem HPV muito provavelmente não tem lesão de alto grau/câncer, sendo o HPV uma condição necessária (infecção persistente por HPV oncogênico), mas não suficiente por si só, uma vez que de milhões de mulheres infectadas pelo HPV apenas alguns milhares virão a desenvolver câncer.

Com esta enorme aplicação que se abriu, diversos testes moleculares para HPV foram desenvolvidos. Esses testes podem ser separados de acordo com o princípio metodológico e a molécula-alvo, como mostrado a seguir.

#### *Teste de amplificação de sinal*

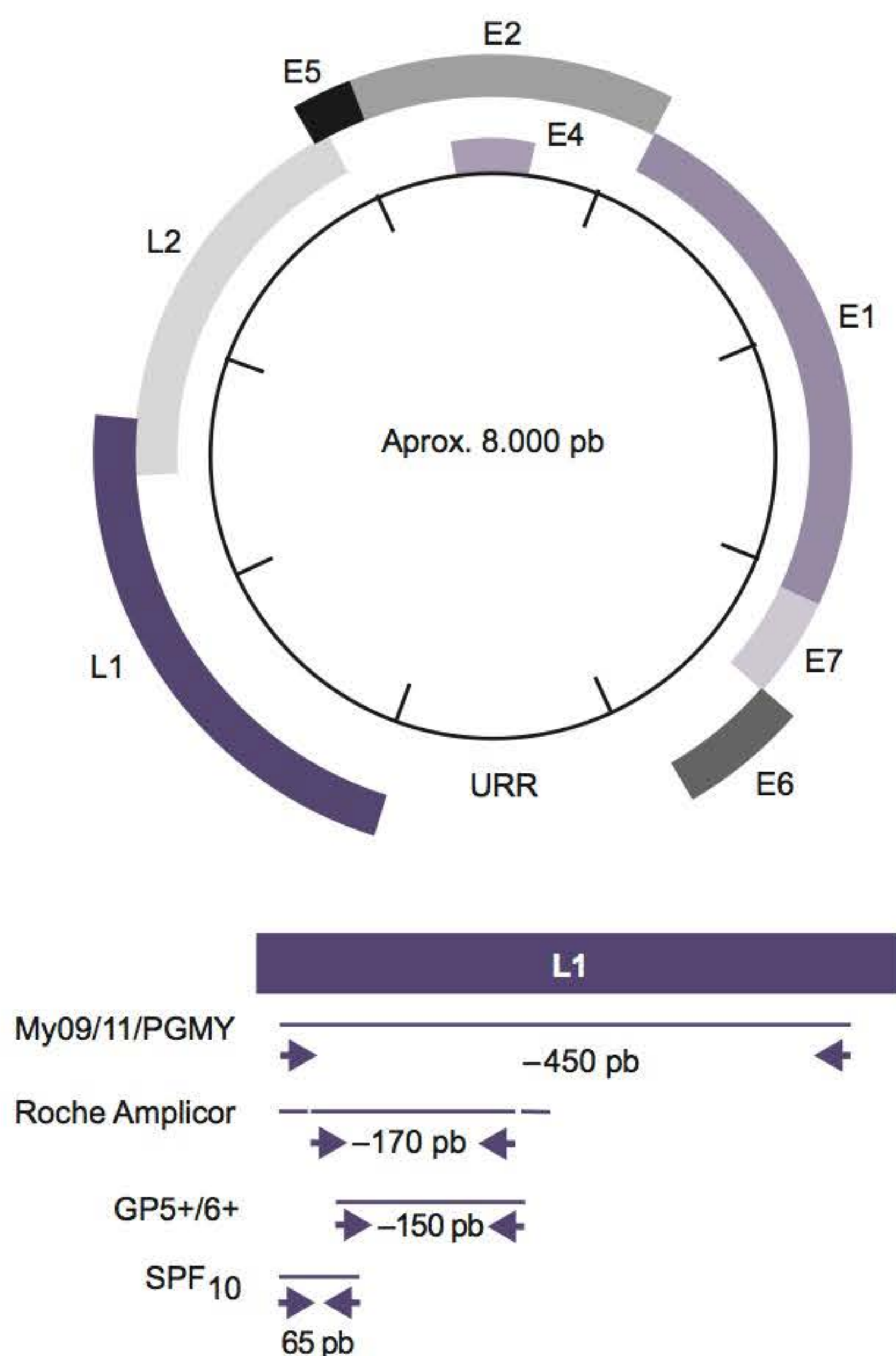
Trata-se de teste molecular, que emprega a tecnologia de ácidos nucleicos recombinantes, porém não há amplificação do material genético viral, mas sim do sinal provocado pela presença do DNA de HPV nas células esfoliadas da cérvix.

O primeiro teste de HPV a chegar ao mercado, e até hoje o de maior utilização em todo o mundo, é o teste de captura híbrida (Qiagen®). Trata-se de um método de hibridização do DNA viral provindo da amostra com sondas sintéticas de RNA complementares ao DNA dos HPV de alto risco para câncer (13 tipos) e de baixo risco (5 tipos). O híbrido RNA:DNA é capturado por um anticorpo antitripla hélice e posteriormente revelado por meio de métodos convencionais enzimático-colorimétricos.<sup>9</sup> O resultado indica se a paciente está infectada por um ou ambos os grupos de HPV e dá um valor semiquantitativo que guarda uma boa relação clínica, ou seja, quanto maior o valor de leitura, maior a chance de uma lesão HPV-induzida estar presente. Outros agentes infecciosos ginecológicos foram acrescentados ao teste, que possibilita a detecção também de gonococos e clamídia. As principais críticas a este método são a falta de um controle interno de adequação da amostra, ou seja, na ausência de células por problemas de coleta, o resultado será sempre negativo, possibilitando a ocorrência de falso-negativos. Sabe-se que mulheres após a menopausa frequentemente apresentam coletas com baixo número de células, e é esta faixa etária (> 45 anos) a de maior incidência da doença. Outra deficiência é que o método não identifica individualmente os tipos de HPV, não permitindo a avaliação da persistência viral, já que uma paciente pode estar infectada em um momento por HPV 16 e em um momento posterior por HPV 18. Do ponto de vista do risco para câncer, esta paciente não tem infecção persistente, portanto o risco é baixo, mas a captura híbrida irá acusar dois testes consecutivos reativos para HPV oncogênico.



### Testes com base em PCR

Métodos fundamentados em amplificação de ácidos nucleicos, principalmente a PCR, revolucionaram o entendimento da epidemiologia do câncer cervical. Logicamente, esses métodos foram sendo aprimorados para uso no diagnóstico e manejo desta doença. A princípio, métodos *in-house* foram empregados, desenvolvidos nos próprios laboratórios de análise, frequentemente de boa sensibilidade, mas de difícil comparação interlaboratorial. Devido à alta sensibilidade apresentada, a correlação clínica costuma ser baixa, pois muitas mulheres estão infectadas por HPV sem qualquer implicação clínica, e a maior parte das infecções tem caráter transitório e assintomático. Os testes com base em PCR têm outras vantagens, como a possibilidade de uso de diferentes tipos de amostras biológicas (células esfoliadas, biopsias, tumores, lavado cervicovaginal e outras). Atualmente estão disponíveis muitos testes semelhantes para a detecção de HPV por meio de amplificação por PCR. Em geral esses testes baseiam-se na homologia existente no gene L1 entre os diferentes tipos de HPV, em que são alocados os *primers* que delimitam a região amplificada. O conjunto de *primers* genéricos denominados MY09/11 é capaz de detectar um grande número de tipos, por meio da amplificação de uma região de 450 pares de bases deste gene.<sup>10</sup> Esses primers foram sendo aprimorados e constituem a base do teste usado pela empresa Roche em seu *kit* Linear Array HPV Genotyping Test®. Outros *primers* bastante utilizados nesta região são o par GP5+/6+, desenvolvido e utilizado pelo grupo holandês, e o par SPF10, também criado na Holanda<sup>11</sup> (Figura 8.5).



**Figura 8.5** Esquema do genoma do HPV com detalhamento da região L1 e os principais conjuntos de *primers* em uso amplificando fragmentos de diferentes tamanhos. pb = pares de bases.

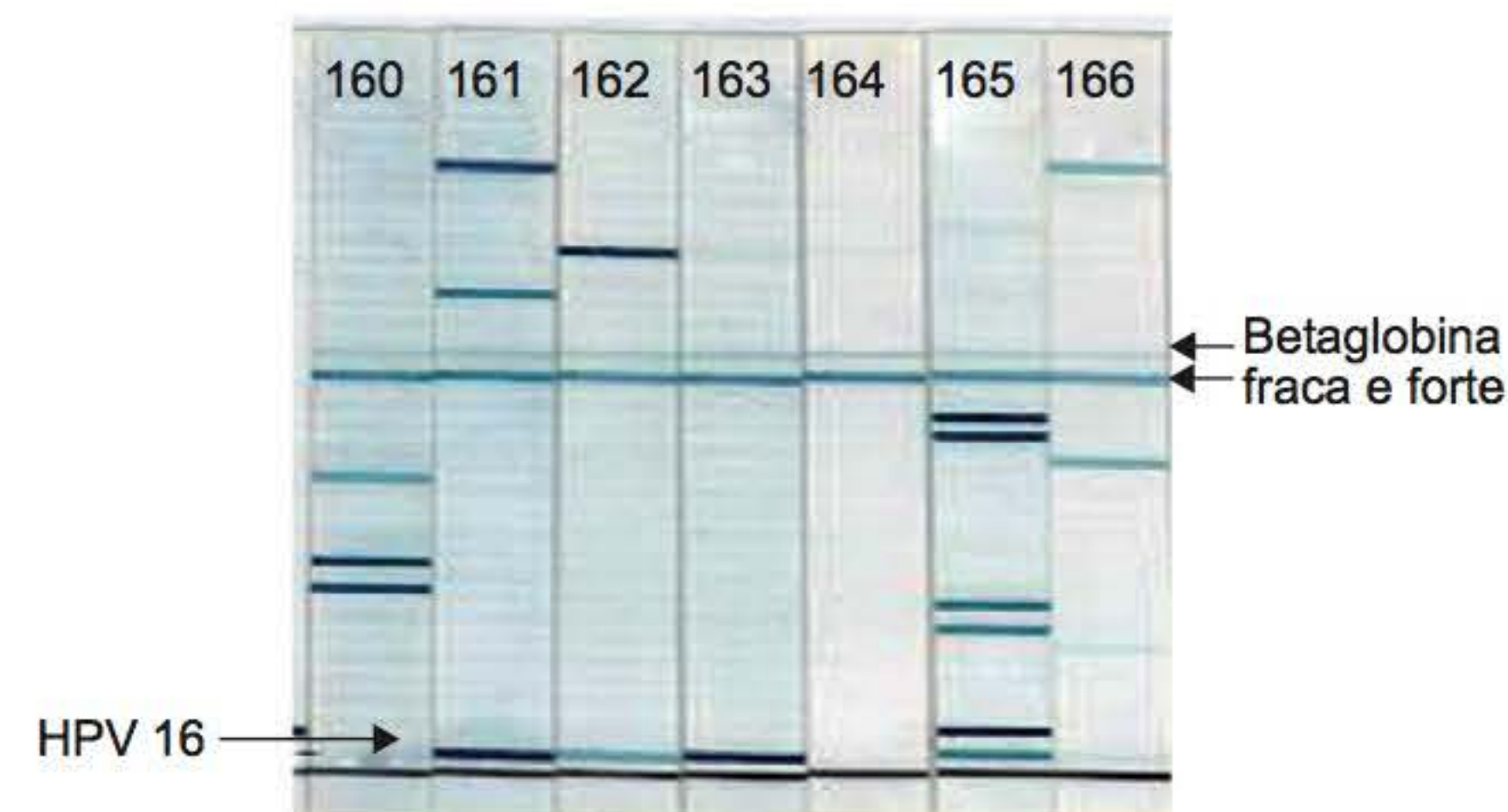
Essa região L1 é muito atraente como alvo diagnóstico porque, além de ter um grau de conservação nucleotídica que possibilita o uso de *primers* que cobrem uma ampla gama de HPV, exibe variabilidade interna suficiente para tipar esses mesmos HPV. No passado usava-se um sistema de digestão com 7 enzimas de restrição que produziam um perfil tipo-específico.<sup>12</sup> Atualmente, essa tipagem costuma ser feita em uma etapa de hibridização com sondas específicas posterior à amplificação. Essas sondas podem estar aderidas em uma fita de nitrocelulose, e o uso de *primers* biotinizados possibilita a revelação colorimétrica da hibridização sonda:amplicon para a identificação específica do(s) tipo(s) de HPV presente(s) (Figura 8.6). São métodos trabalhosos, porém mais robustos e fundamentais na avaliação de infecções múltiplas, muito frequentes em imunossuprimidos.<sup>13</sup>

### Arrays

Por haver grande quantidade de tipos de HPV, e haver interesse específico em se individualizar o(s) tipo(s) presente(s) na amostra, a tipagem de HPV é uma necessidade laboratorial à qual a tecnologia de arrays presta-se muito bem. Um método já disponível comercialmente é o PapilloCheck® (Greiner Bio-One), que emprega o formato de *microarrays* de sondas aderidas em uma lâmina de plástico. O método trabalha com amplificação de uma região bastante variável dos HPV, o gene E1, porém a hibridização para tipagem se faz sobre uma lâmina contendo centenas de sondas (*microarrays*) possibilitando a tipagem de uma maneira extremamente controlada e confiável, também incluindo diversos controles internos e externos de amplificação e hibridização.<sup>14</sup> A análise neste caso se faz por um leitor de fluorescência e um *software* que interpreta as combinações de cor providas da lâmina hibridizada, transformando-as em um resultado válido e compreensível.

### RNA mensageiro viral

Devido ao grande número de mulheres que abrigam HPV oncogênicos sem significado clínico, os pesquisadores de alguns laboratórios estão buscando outros marcadores que possibilitem identificar, entre as pacientes HPV-positivas, aquelas que se encontram sob risco de evolução maligna ou mesmo já apresentam lesões. Desse modo, sugeriu-se que a presença do RNA mensageiro que codifica para as duas oncoproteínas virais E6 e E7 (E6/E7 mRNA) seria o marcador ideal, uma vez que identifica a expressão do genoma viral, e



**Figura 8.6** Sete amostras de pacientes HIV+ submetidas ao teste de Linear Array (Roche). Infecção por múltiplos tipos são observadas nas amostras 160, 161, 162, 165 e 166. A amostra 163 apresenta infecção apenas por HPV 16, enquanto a amostra 164 é negativa para HPV-DNA.<sup>13</sup>



	Captura híbrida 2	PCR (MY09/11)	PCR (FP5+/GP6+)	Linear Array (PGMY09/11)	INNO-LiPA (SPF10)	PapilloCheck (E1)	Pre Test HPV-Proofer (E6/E7)	APTIMA HPV Assay (E6/E7)
Sonda	Pool de sondas RNA	Primers degenerados	Primers consenso	Primers consenso	Primers consenso	DNA	RNAm E6/E7	RNAm E6/E7
Alvo	Híbridos RNA-DNA	Fragmento 450 pb	Fragmento 150 pb	Fragmento 450 pb	Fragmento 65 pb	Fragmento 350 pb	Variável	Variável
Sensibilidade analítica	25-75 fg	0,1-100 fg	0,5-10 fg	900-3.000 cópias/célula	0,1-10 fg	30-150 fg	0,01 cópias/célula	250 cópias/célula
Número de genótipos de HPV detectados	13	39	20	37	26	24	5	14
Aprovação FDA / CE / Anvisa	Sim/Sim/Sim	Não/Não/Não	Não/Não/Não	Sim/Sim/Sim	Não/Sim/Não	Não/Sim/Sim	Não/Sim/Sim	Não/Sim/Não
Kit comercialmente disponível	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Nível de reação cruzada	Baixo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Quantificação DNA HPV	Semi-quantitativo	Possível, mas não otimizado	Possível, mas não otimizado	Qualitativo	Qualitativo	Qualitativo	Qualitativo	Qualitativo
Infecção múltipla	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Sensibilidade	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Especificidade	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta

**Figura 8.7** Informações comparativas de alguns métodos moleculares de detecção de HPV.<sup>8</sup>

não apenas sua presença ou mesmo a replicação.<sup>15,16</sup> Dois testes que detectam este analito passaram por intensa avaliação clínica, chegando ao mercado em 2010: o Proofer® (Norchip) e o Aptima® (GenProbe). Mesmo com a introdução das vacinas, persiste a necessidade da realização dos testes para prevenção do câncer cervical, uma vez que as vacinas só se mostram protetoras em mulheres virgens de infecção, sendo inócuas para as mulheres que já tiveram infecção por estes HPV contidos na vacina. Outro ponto é que os HPV contidos na vacina não cobrem todos os casos de câncer cervical, portanto, enquanto houver a possibilidade de neoplasia causada por um HPV sem cobertura na vacina, mesmo as mulheres vacinadas deverão continuar realizando o exame periódico.<sup>17</sup> A comparação entre os diversos testes disponíveis encontra-se na Figura 8.7.

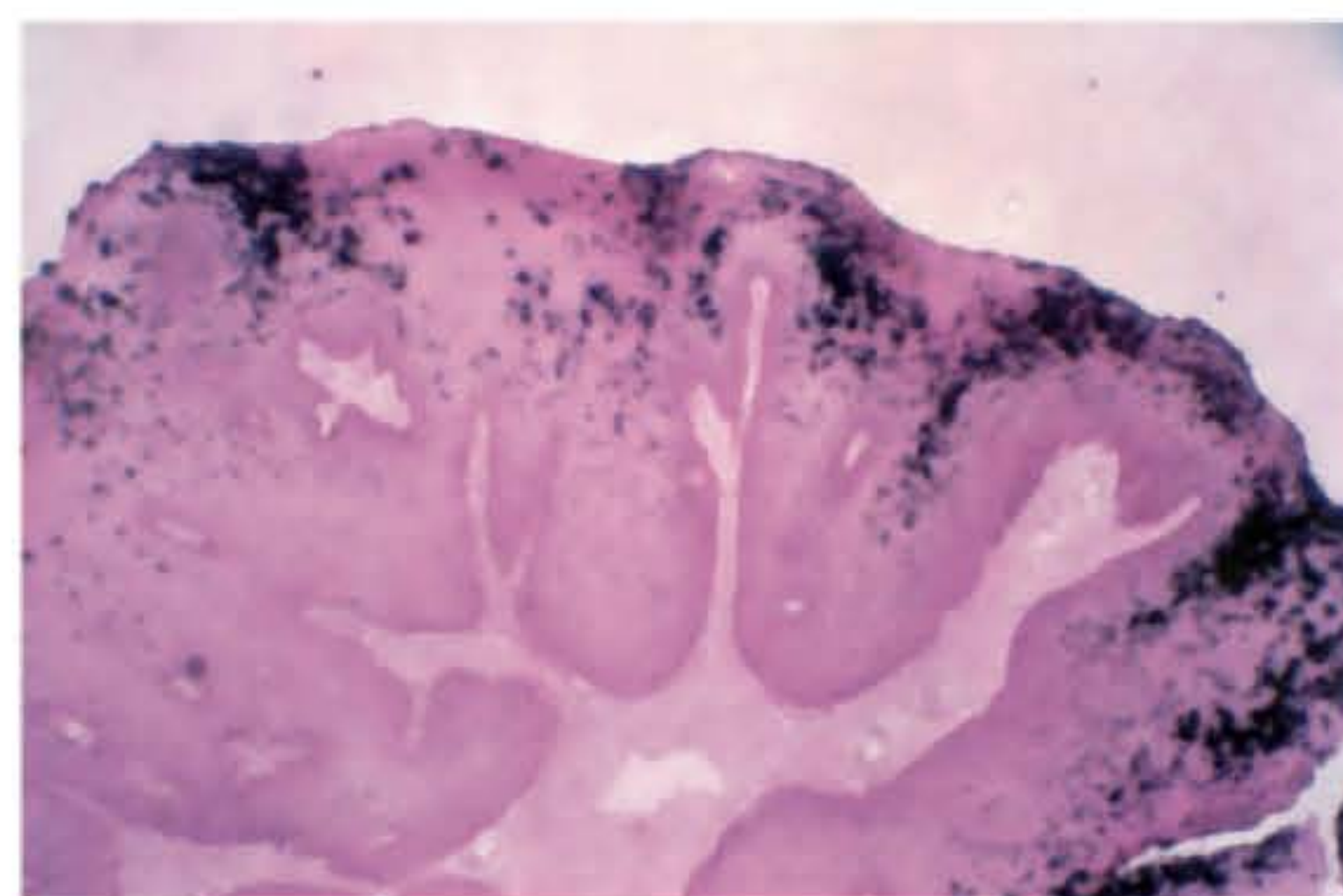
### Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* promove a hibridização de sondas HPV-específicas, marcadas com compostos radioativos ou colorimétricos, sobre um corte histológico de material fixado e parafinado. Embora esta técnica torne possível a associação dos dados moleculares com as características histológicas, é extremamente trabalhosa e de baixa sensibilidade, tendo poucas aplicações adequadas na prática laboratorial. Um exemplo de corte histológico positivo para HPV é ilustrado na Figura 8.8.

### ■ Uso dos testes de HPV no rastreamento de câncer cervical

Nesse momento, diversas nações têm discutido e avaliado se a substituição do exame citológico por um teste molecular pode apresentar melhores resultados médicos e econômicos.<sup>19</sup> Um teste mais sensível significa menor

número de mulheres com câncer, menor custo ao sistema e possibilita maior espaçamento no tempo da realização do exame periódico. Igualmente, um teste mais específico significa menor número de mulheres encaminhadas para exames complementares, como a colposcopia seguida de biopsia ou mesmo tratamentos desnecessários. O ponto crítico dos exames moleculares é que são, sem dúvida, mais sensíveis, mas ainda menos específicos que os exames citológicos de qualidade. Por outro lado, são automatizáveis e mais baratos que os exames convencionais. Provavelmente os exames citológicos serão, no futuro próximo, deslocados da posição de triagem primária para exames confirmatórios, realizados após um resultado molecular persistentemente positivo para HPV oncogênico.<sup>20</sup>



**Figura 8.8** Corte de papilomatose de laringe corado com hematoxilina e eosina, hibridizado com sondas radioativas de HPV 6 e 11. Os pontos pretos indicam núcleos de células contendo grande quantidade de DNA desses HPV.<sup>18</sup>



## ▪ Uso dos testes de HPV na triagem de pacientes com citologia alterada/indeterminada

Uma das aplicações mais frequentes do teste para HPV acontece quando uma paciente apresenta o resultado citológico de ASCUS (*Abnormal Squamous Cell of Undetermined Significance*). Essa categoria é uma espécie de zona cinzenta em que o citopatologista reconhece que as células não são normais, porém não está caracterizada a presença de displasia. Nesse caso um ASCUS com o achado de HPV-DNA de alto risco deve ser investigado, enquanto aquele no qual HPV de alto risco estão ausentes pode ser interpretado como sem maior significado clínico, e a paciente retorna à rotina de rastreamento. A mesma situação também se aplica quando o achado citopatológico é de LIE-BG (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau). Quando ocorre na ausência de HPV de alto risco, não se considera a necessidade de mais investigações.<sup>21</sup>

## ▪ Uso dos testes de HPV pós-tratamento

Vários estudos demonstraram que a presença de DNA de HPV de alto risco após o tratamento para a neoplasia intraepitelial cervical é um indicador de falha terapêutica, ao mesmo tempo em que sua ausência é um indicador seguro de eficácia, possibilitando a reintegração da paciente aos esquemas regulares de rastreamento.

## ▪ Carga viral e infecções múltiplas

A carga viral de HPV ainda é um assunto bastante controverso. Embora vários estudos tenham encontrado um gradiente de carga viral maior em lesões mais avançadas (normal < displasia leve < moderada < grave) essa relação se perde na ponta mais preocupante do espectro, que são o carcinoma *in situ* e invasivo.<sup>22</sup> Isso se dá porque nos carcinomas a replicação viral é muito baixa ou inexistente, embora a expressão de E6/E7 seja necessária para a manutenção da transformação celular. Diferenças metodológicas também contribuem para a indefinição do tema, pois os estudos utilizam diferentes maneiras de normalizar a carga viral (por célula, por ng de DNA, por cópias de um gene endógeno, sem normalização etc.), impedindo a comparação direta de resultados entre laboratórios.<sup>22</sup>

O papel das infecções múltiplas, ou seja, infecções concomitantes por mais de um tipo de HPV, também tem dados contraditórios. Alguns estudos apontam que essas infecções múltiplas conferem à paciente um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasia em relação àquelas infectadas por um único tipo.<sup>23</sup> No entanto, outras pesquisas verificam que é mais frequente a infecção múltipla em mulheres assintomáticas do que nas lesões em que se detecta normalmente apenas um tipo de HPV.<sup>13</sup> Esses achados sugerem que a infecção por múltiplos tipos seja, na verdade, um marcador de má resposta imune à infecção por HPV, embora a gênese de uma lesão intraepitelial seja clonal, partindo de uma única célula imortalizada por um único tipo viral. Novamente, a questão técnica influencia muito essa discussão, uma vez que métodos mais eficientes de identificação de infecções múltiplas tornaram-se disponíveis apenas nos últimos anos.

## ► Referências bibliográficas

1. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int J Cancer* 1980; 25:605-609.
2. Internacional Agency for Research on Cancer Working Group. Human papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans 1995; 64: IARC.
3. Villiers EM, Fauquet C, Broker TR *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-527.
4. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6):518-27.
5. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *JNCI* 1999; 91: 506-511.
6. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:453-459.
7. INCA. Estimativa 2010. Incidência de câncer no Brasil. I. N. D. Câncer. 2009.
8. Ramos KS. Tese de Doutorado, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, 2010.
9. Lorincz AT. Hybrid Capture™ method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res* 1996; 22: 629-636.
10. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38:357-361.
11. De Roda Husman A-M, Walboomers JMM, van den Brule AJC *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3'ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gene Virol* 1995; 76:1057-1062.
12. Bernard HU, Chan SY, Manos MM *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170:1077-1085.
13. Levi JE, Fernandes S, Tatenos AF *et al.* Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecologic Oncology* 2004; 92(1): 226-232.
14. Dalstein V, Merlin S, Bali C *et al.* Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *Journal of Virological Methods* 2009; 156: 77-83.
15. Moldena T, Kraus I, Skomedal H *et al.* PreTect™ HPV-Proofer: Real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *Journal of Virological Methods* 2007; 142:204-212.
16. Dockter J, Schroder A, Eaton B *et al.* Analytical characterization of the APTIMA® HPV Assay. *Journal of Clinical Virology* 2009; 45 suppl1: S39-S47.
17. Harper DM. Current prophylactic HPV vaccines and gynecologic premalignancies. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2009; 21:457-464.
18. Levi JE, Delcelo R, Alberti V *et al.* Human papillomavirus DNA in respiratory papillomatosis detected by "in situ" hybridization and the polymerase chain reaction. *American J of Pathology* 1989; 6:1179-1184.
19. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P *et al.* Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ* 2008; 337: a1754.
20. Longatto-Filho A, Schmitt FC. Gynecological cytology: too old to be a pop star but too young to die. *Diagnostic Cytopathology* 2007; 35:672-673.
21. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P *et al.* Clinical utility of HPV-DNA detection: Triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: An update of pooled evidence. *Gynecologic Oncology* 2005; 99:S7-S11.
22. Franco EL, Coutlée F. Prognostic value of measuring load of human papillomavirus DNA in cervical samples: an elusive target. *JNCI* 2009; 101:131-133.
23. Dal Bello B, Spinillo A, Alberizzi P *et al.* Cervical infections by multiple human papillomavirus (hpv) genotypes: prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *Journal of Medical Virology* 2009; 81:703-712.



## Capítulo 9

---

# Infecção por HTLV-I e HTLV-II

*José Marcos Pereira Costa,  
Emanuela Avelar Silva Costa e  
Aluísio Augusto Cotrim Segurado*

- Agente etiológico, 121
- Resposta imunológica à infecção por HTLV, 122
- Patogênese e manifestações clínicas, 122
- Epidemiologia, 123
- Diagnóstico, 125
- Referências bibliográficas, 131



## ► Agente etiológico

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-I, do inglês *human T cell lymphotropic virus type I*) foi o primeiro retrovírus humano descrito, ao ser isolado do sangue periférico de um paciente com linfoma de células T com manifestações cutâneas.<sup>1</sup> Dois anos depois, outro retrovírus geneticamente relacionado foi identificado em linfócitos esplênicos de um paciente com tricoleucemia de células T, sendo denominado HTLV-II.<sup>2</sup> Ambos os vírus foram integrados à família Retroviridae, à subfamília Orthoretrovirinae e ao gênero *Deltaretrovirus*. Subsequentemente, um terceiro retrovírus humano foi isolado e denominado vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo posteriormente identificado como o agente causal da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immune deficiency syndrome*) e classificado na subfamília Lentivirinae.<sup>3</sup> A Figura 9.1 ilustra as relações filogenéticas entre os retrovírus.<sup>4</sup>

O HTLV-I é reconhecidamente o agente etiológico de várias doenças humanas, que serão descritas mais detalhadamente neste capítulo, enquanto a infecção por HTLV-II foi raramente associada a casos de afecções neurológicas. Em 2005, foram descritos dois novos genótipos de HTLV, denominados HTLV-III e HTLV-IV, em indivíduos assintomáticos que habitavam o sul da República de Camarões, na África Central; porém, até o momento não se demonstrou associação dessas infecções com doença humana.<sup>5,6</sup>

## ▪ Estrutura da partícula viral

Os vírus HTLV-I e HTLV-II são partículas de forma esférica a pleomórfica (vírions), com 80 a 100 nanômetros de diâmetro, morfologicamente semelhantes às dos demais retrovírus, constituídas por um *core* central elétron-denso e um envoltório externo glicoproteico. O envoltório contém uma glicoproteína de superfície (gp46) e uma glicoproteína transmembrana (gp21), além da camada bilipídica, derivada da membrana celular da célula eucariótica infectada. Junto à membrana do envelope está a matriz, composta pela proteína

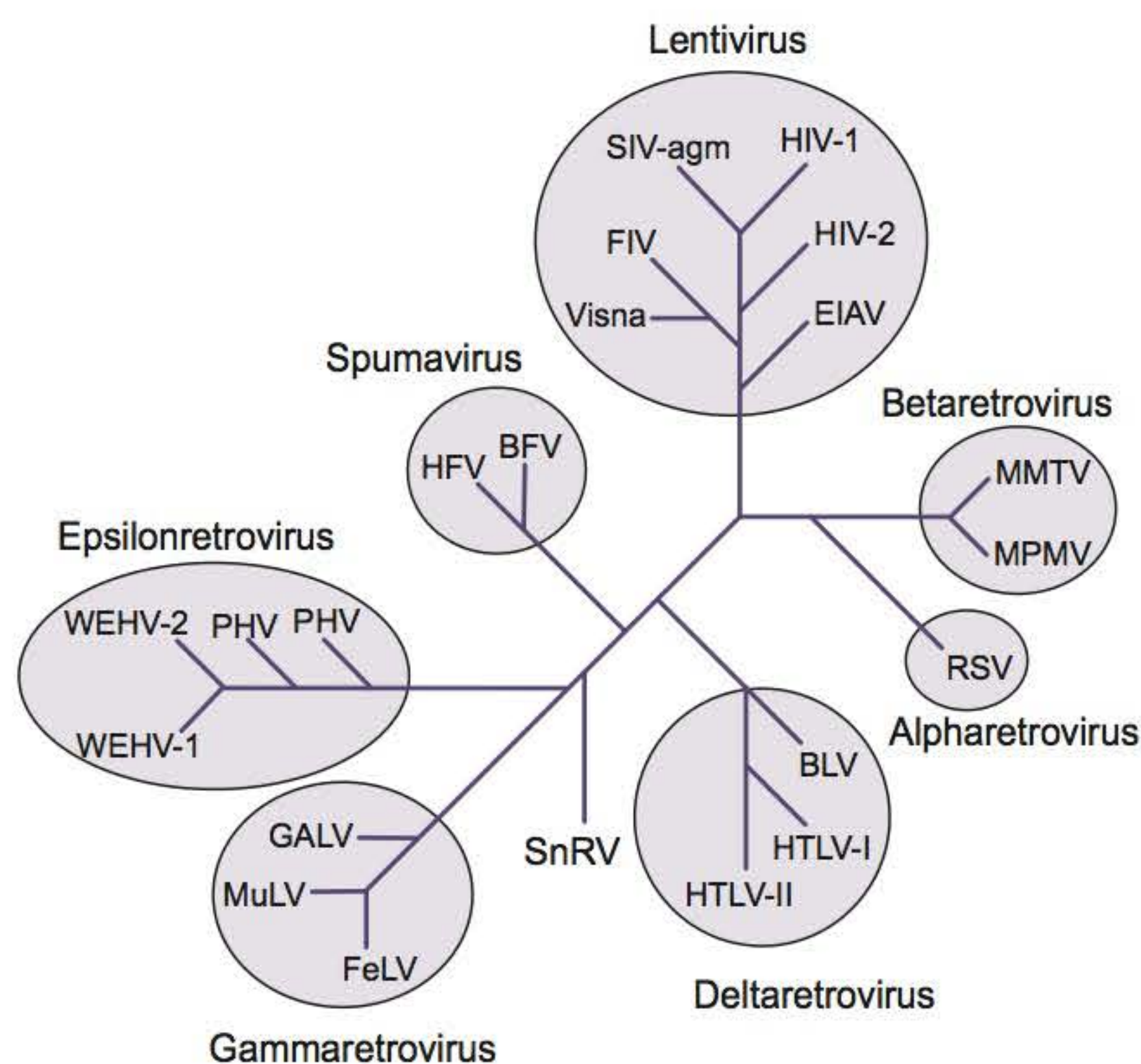
Gag (p19). O capsídeo apresenta simetria icosaédrica e é composta por proteínas codificadas pelo gene *gag* (p24), constituindo o cerne viral. A porção central do vírion contém duas cópias de ácido ribonucleico (RNA) de fita diméricas de polaridade positiva e pela enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do genoma viral de RNA para cDNA (provírus)<sup>11</sup> (Figura 9.2).

## ▪ Estrutura genômica do HTLV e seus produtos proteicos

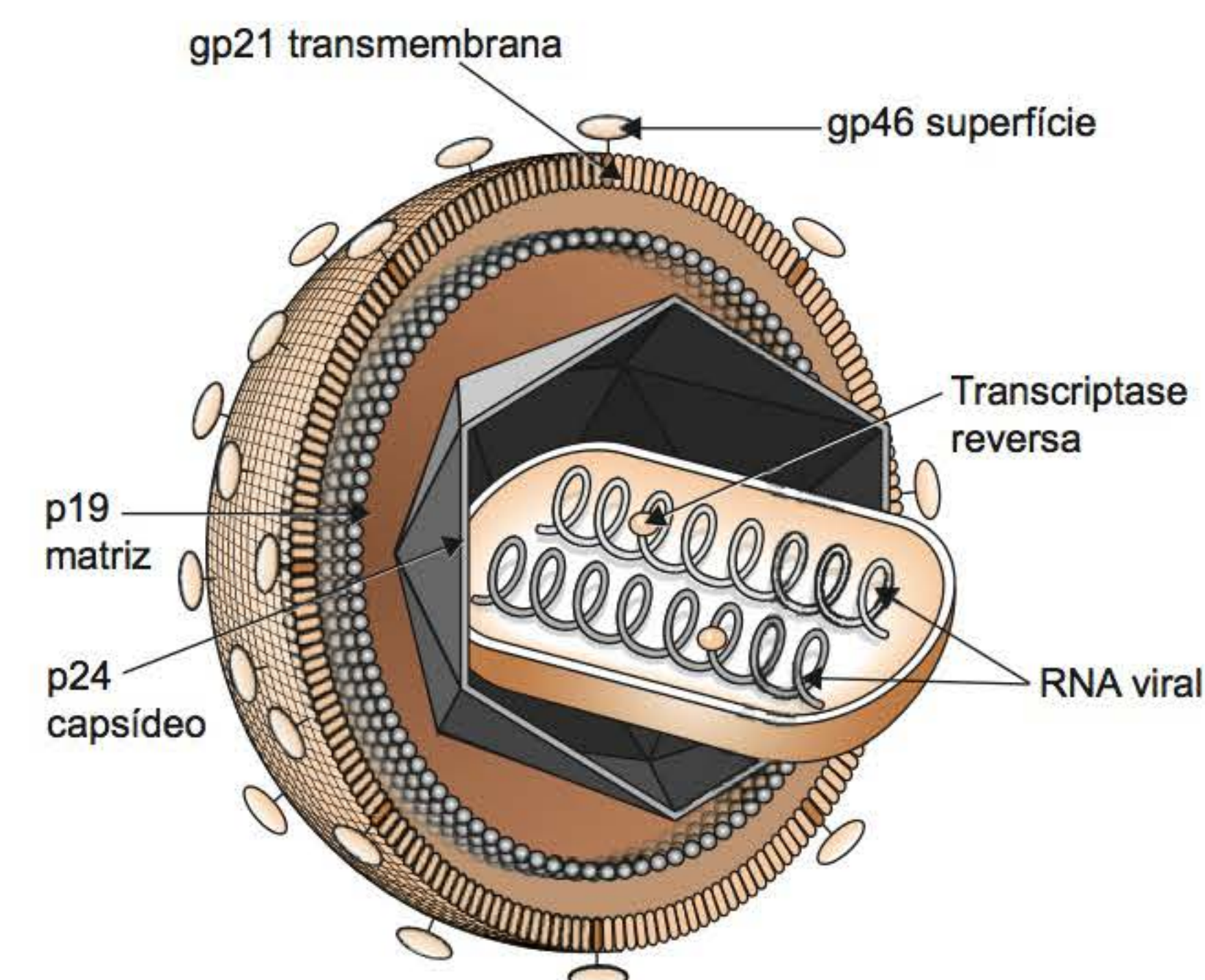
Além dos genes estruturais comuns aos retrovírus (*gag*, *env* e *pol*), o genoma do HTLV-I/II apresenta uma região próxima à extremidade 3', denominada *pX*, que contém os genes reguladores *tax* e *rex*. Nas extremidades 5' e 3' do genoma viral encontram-se as sequências repetitivas longas (LTR), essenciais para a regulação transcricional do genoma (Figura 9.3).<sup>7</sup>

O genoma proviral do HTLV-I e do HTLV-II contém 9.032 nucleotídeos, sendo seus principais elementos e respectivos produtos gênicos:

- **Gene *env*:** codifica as glicoproteínas externas do envoltório (precursora gp61/68 e sua derivada gp46) e a proteína transmembrana (gp21)
- **Gene *pol*:** codifica as enzimas transcriptase reversa (p99), integrase e protease
- **Gene *gag*:** codifica as proteínas do *core* viral (precursora p53 e suas derivadas p15, p19 e p24)
- **Gene *tax*:** codifica a proteína p40<sup>tax</sup>, transativadora do segmento LTR viral e de genes da célula eucariótica infectada
- **Gene *rex*:** codifica a proteína p27<sup>rex</sup>, reguladora pós-transcricional da síntese de proteínas estruturais do vírus
- **Proteínas p12/p30:** codificadas pelo gene *ORF I*, interage com cadeias do receptor de IL-2
- **Segmentos LTR:** encontradas nas extremidades do genoma proviral, contêm as regiões reguladoras da transcrição viral
  - **Segmento 3' LTR:** codifica uma proteína denominada fator HTLV-I bZIP (HBZ, do inglês *HTLV-I basic zipper factor*), que estimula a replicação viral e proliferação celular.

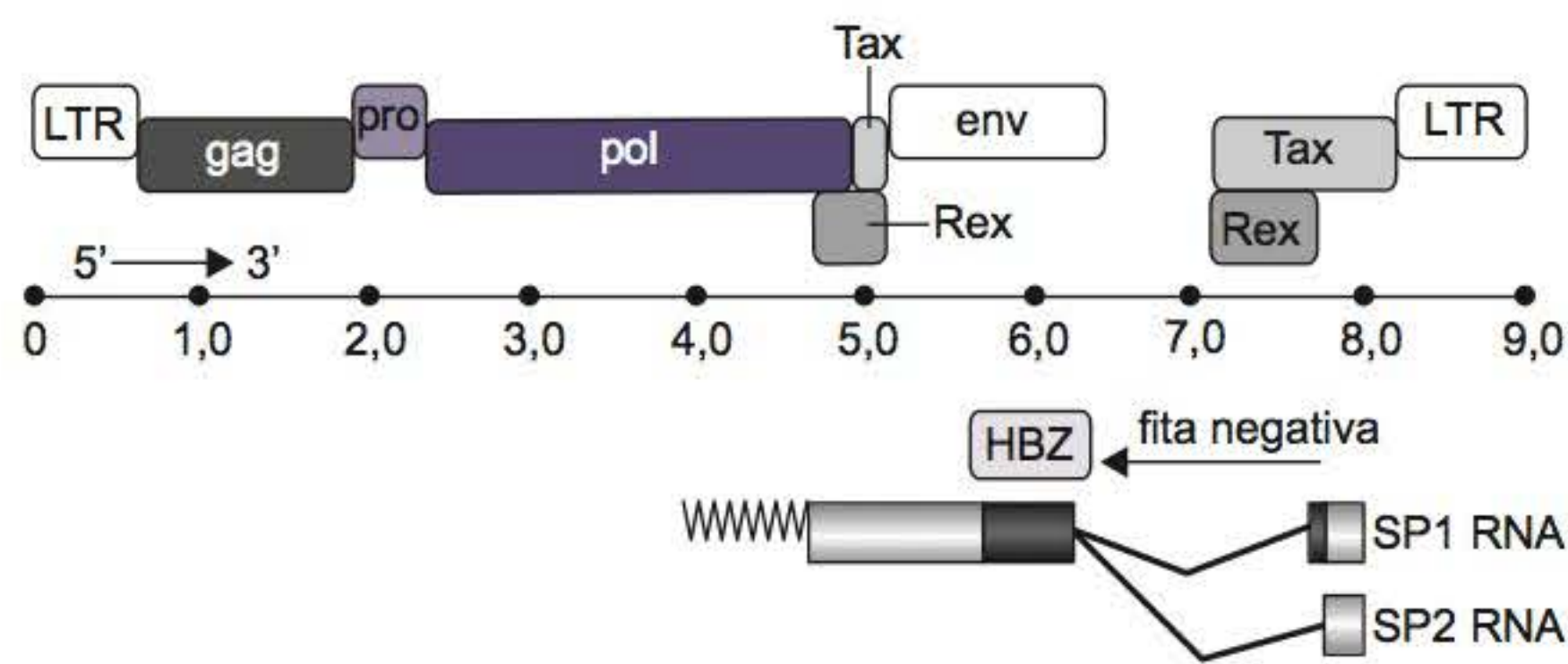


**Figura 9.1** Análise filogenética de regiões conservadas do gene da polimerase dos retrovírus. Adaptada de Quackenbush e Casey, 2005.<sup>4</sup>



**Figura 9.2** Estrutura da partícula viral do HTLV-I/II. gp46, glicoproteína de 46 kDa; gp21, glicoproteína de 21 kDa; p19, proteína de 19 kDa; p24, proteína de 24 kDa.





**Figura 9.3** Representação esquemática do genoma do HTLV-I.

Embora o HTLV-I e o HTLV-II se diferenciem, principalmente no gene *pX*, apresentam cerca de 65% de similaridade genética do genoma. Com propriedades biológicas semelhantes, agem infectando linfócitos humanos, sendo que o tipo I tem tropismo preferencial por linfócitos T de fenótipo CD4+, enquanto o tipo 2 por linfócitos T CD8+.<sup>8,9</sup> Ambos têm a capacidade de integrar-se ao genoma da célula hospedeira e, nessa forma, recebem a denominação de provírus.<sup>10,11</sup>

Apesar de apresentarem uma estrutura genômica comum, os HTLV-I e HTLV-II diferem em suas propriedades patogênicas, que são geralmente atribuídas às proteínas transativadoras Tax, denominadas Tax 1 e Tax 2, respectivamente.<sup>12</sup> Ambas são responsáveis pela indução e expressão de genes celulares e pela promoção indireta da transcrição do genoma proviral.<sup>11</sup> Esses efeitos da Tax podem interferir nas funções da célula hospedeira em diferentes níveis, afetando a transcrição e a tradução de vários genes celulares, tais como genes de citocinas e proto-oncogenes, que podem influenciar no desenvolvimento da infecção e na patogênese das doenças associadas ao HTLV-I.<sup>11,12</sup>

## ► Resposta imunológica à infecção por HTLV

O HTLV-I, ao infectar células T CD4+ e levar à síntese dos produtos gênicos anteriormente enumerados, induz resposta imune humoral, com produção de anticorpos dirigidos inicialmente a antígenos de superfície viral (gp46, gp21) e, posteriormente, do *core* (p15, p19, p24). Há também indução de resposta do tipo celular (células T citotóxicas), direcionada principalmente à proteína Tax. Estudos detalhados dos diversos antígenos virais tornaram possível identificar os principais epítopos imunodominantes para células B, quais sejam:

- As porções carboxilterminal da p19 gag e aminoterminal da p15 gag de HTLV-I e HTLV-II, que apresentam sororreatividade cruzada com antígenos celulares
- Epítopos conformacionais descontínuos da p24 gag
- A porção central da glicoproteína viral externa (gp46) e a região central da glicoproteína transmembrana (gp21).

## ► Patogênese e manifestações clínicas

Embora a maior parte dos indivíduos infectados por HTLV-I ou HTLV-II permaneça assintomática por toda a vida, reconhece-se, atualmente, o papel etiológico do HTLV-I em alguns desfechos clínicos, tais como a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), doença de alta incidência no sul do Japão,<sup>13</sup> e a paraparesia espástica tropical/mielopatia

associada ao HTLV-I (PET/MAH), mielopatia crônica descrita em pacientes do Caribe<sup>14</sup> e, posteriormente, identificada no Japão.<sup>15</sup> Além dessas doenças, síndromes inflamatórias, tais como uveíte, polimiosite, artropatias, síndrome de Sjögren e dermatopatias, como a dermatite infecciosa e a ictiose adquirida, diversas manifestações oculares e afecções pulmonares também vêm sendo associadas à infecção por HTLV-I. Estudos epidemiológicos estimam o risco de adoecimento de indivíduos infectados por HTLV-I em cerca de 1 a 4% ao longo da vida.<sup>16</sup>

Ao contrário do HTLV-I, o HTLV-II não está associado a uma doença específica, embora existam relatos de casos de mielopatias crônicas e de manifestações neurológicas clinicamente semelhantes às da PET/MAH em pacientes soropositivos para HTLV-II,<sup>10,17,18</sup> o que aponta para um possível potencial neuropatogênico desse vírus.

Os mecanismos patogênicos dos HTLV que determinam a evolução da infecção do estado assintomático para quadros hematológicos ou neurológicos clinicamente relevantes ainda não estão totalmente elucidados. Contudo, estudos recentes apontam mais para maior influência de fatores genéticos do hospedeiro (processos imunológicos e de transativação gênica) do que para fatores virais, uma vez que a variabilidade genética dos HTLV-I é baixa.<sup>19</sup>

Além dos linfócitos T, os HTLV também infectam células endoteliais e fibroblastos. As proteínas codificadas pelo gene *tax* do HTLV-I (p40<sup>tax</sup>) e do HTLV-II (p37<sup>tax</sup>) desempenham papel importante nos processos de imortalização celular, oncogênese e inflamação. Localizadas no núcleo dos linfócitos infectados, elas estimulam a transcrição de genes virais e celulares, sendo essenciais na transformação de linfócitos. A propriedade de transativação do gene *tax* estimula a produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteínases, tais como interleucina 2 (IL-2) e seu receptor (IL-2R), fatores de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral  $\alpha$ , proteína quimiotática de monócitos e metaloproteínase da matriz, além de ativar proto-oncogenes. A superprodução de interleucinas pode acarretar em inflamação crônica, que caracteriza doenças como a PET/MAH.<sup>20</sup>

Já na ATL, cerca de 60% dos pacientes não expressam proteína Tax, e neles, a proteína HBZ foi recentemente implicada na proliferação de linfócitos T e na indução da leucemia.<sup>19,21</sup> A expressão de mRNA para HBZ é cerca de 20 a 50 vezes menor do que o mRNA para Tax. Contudo, diferentemente do mRNA para Tax, o mRNA para HBZ é consistentemente expresso em células da ATL. Assim, age aumentando a proliferação de células T,<sup>7</sup> mostrando-se fundamental para o desenvolvimento da ATL.<sup>22</sup>

O número aumentado de células T CD4+ periféricas na infecção por HTLV-I pode erroneamente dar a impressão de melhora clínica em pacientes coinfectados pelo HIV-1, ou ainda, interferir na indicação de início do tratamento antirretroviral.<sup>23</sup> Portanto, em pacientes coinfectados pelo HIV/HTLV-I, esse parâmetro laboratorial deve ser cuidadosamente analisado.

### ■ Leucemia/linfoma de células T do adulto

A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) é uma doença maligna de linfócitos T maduros, associada à infecção por HTLV-I,<sup>24</sup> sendo que, dos portadores do vírus, apenas 2 a 3% desenvolvem ATL. Incide preferencialmente em adultos e apresenta-se, na sua forma aguda, clinicamente mais agressiva, como adenomegalia generalizada, acompanhada de hepatosple-



nomegalia, lesões osteolíticas, hipercalcemia e frequentes manifestações cutâneas, em especial a eritrodermia. O sangue periférico de pacientes com ATL apresenta linfócitos com morfologia atípica, exibindo um acentuado pleomorfismo celular em relação ao seu tamanho, irregularidades no núcleo (multilobulado) e no grau de condensação da cromatina nuclear. Em razão dessas características peculiares, as células T típicas da ATL foram denominadas células em flor, do inglês *flower cells* (células ATL), conforme descrição de pesquisadores japoneses<sup>25</sup> (Figura 9.4).

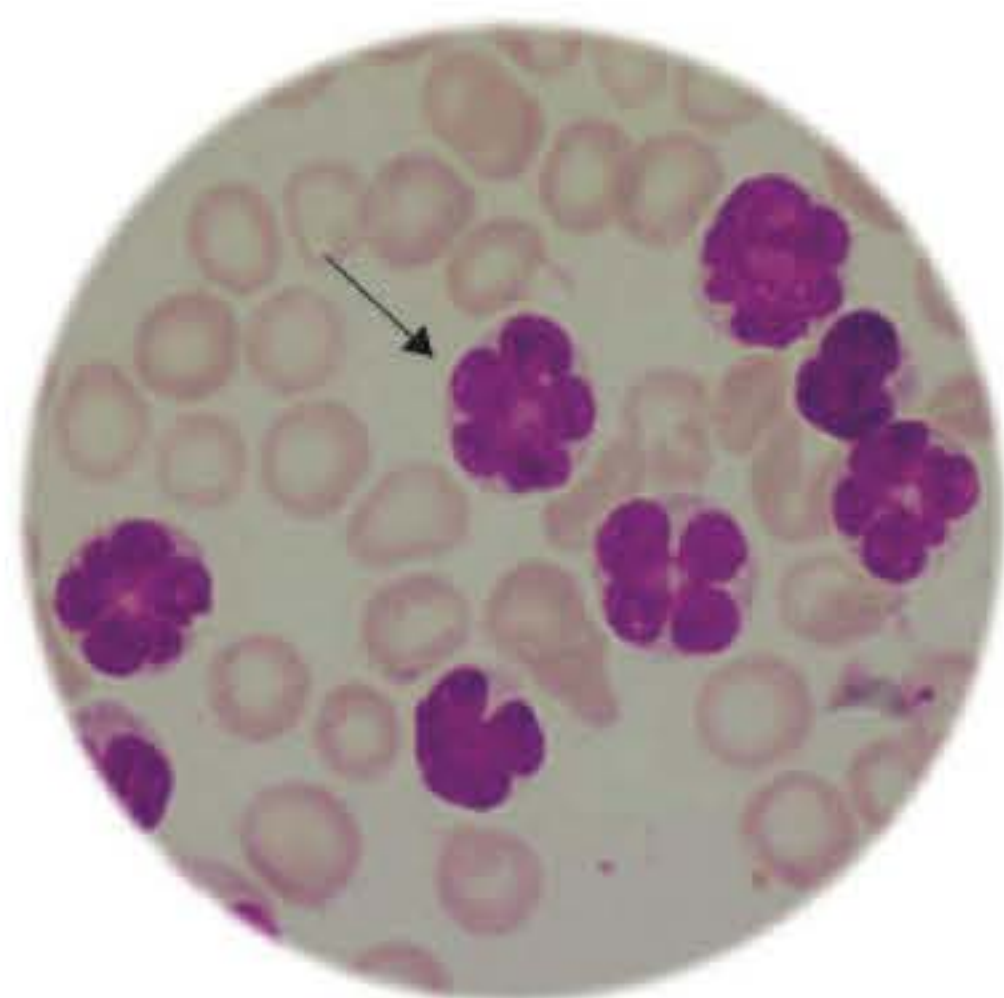
A ATL pode apresentar-se sob diferentes formas clínicas:

- **Aguda:** com os sinais e sintomas anteriormente descritos, acompanhados de hipercalcemia e elevação dos níveis séricos de desidrogenase láctica. Nesses casos encontram-se células ATL em número elevado no sangue periférico
- **Crônica:** predominam quadros de linfonomegalia e de hepatosplenomegalia, acompanhadas de leucocitose. A calcemia é normal, podendo-se observar elevação dos níveis séricos de desidrogenase láctica. Células mononucleares periféricas atípicas correspondem a menos de 10% do total de leucócitos
- **Indolente (smoldering):** com manifestações dermatológicas apenas. Nessa forma clínica a calcemia e os níveis séricos de desidrogenase láctica são normais. Células ATL representam apenas 0,5 a 3% dos leucócitos periféricos
- **Forma linfomatoso:** apresenta quadro de linfonomegalia e sem linfócitos atípicos circulantes.

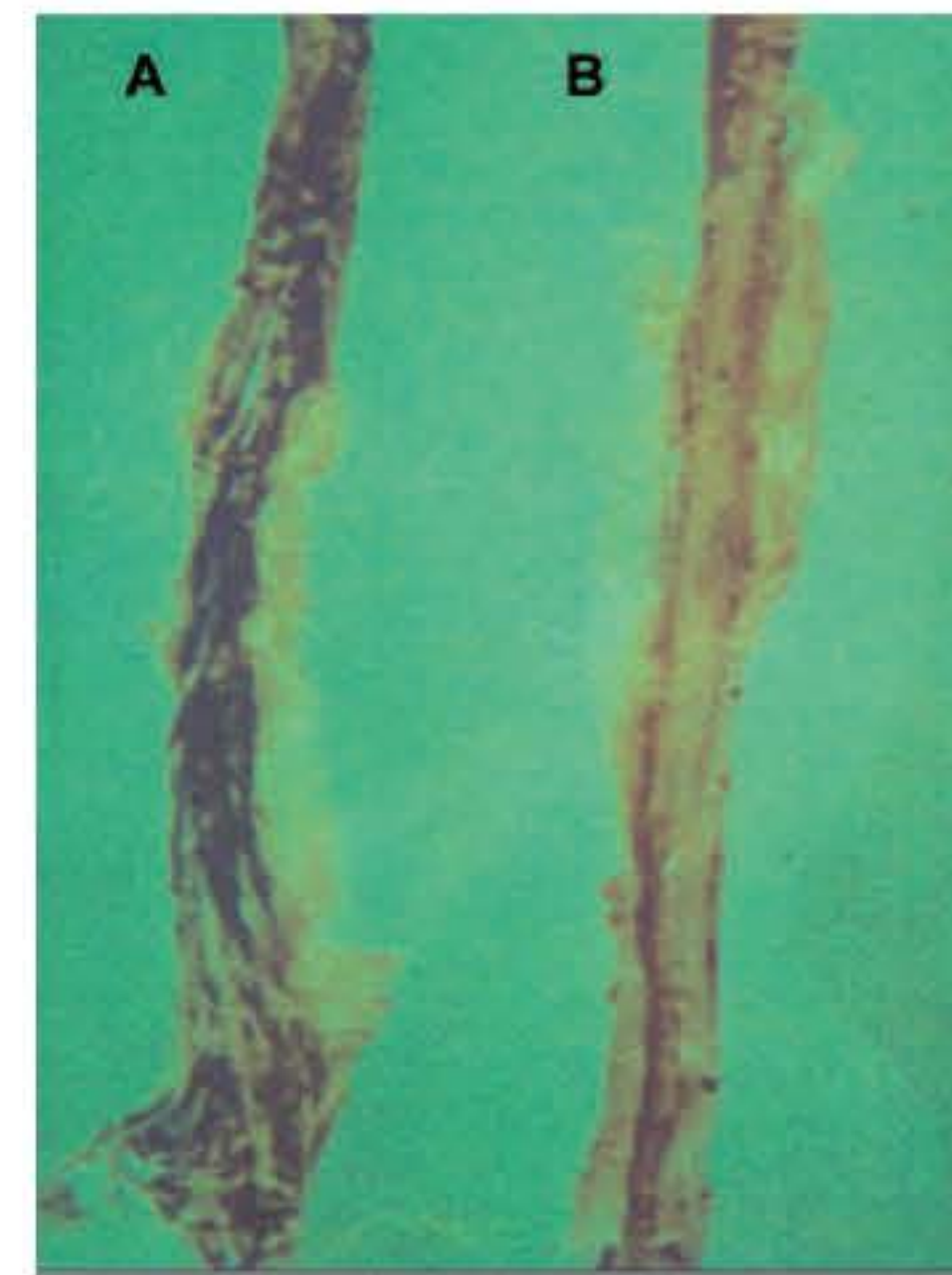
A proliferação leucêmica da ATL é predominantemente monoclonal, com células de fenótipo CD3+, CD4+, CD25+, HLA-DR+. Essa neoplasia hematológica apresenta mau prognóstico, especialmente quando se apresenta sob a forma aguda ou linfomatoso.

### ▪ Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I

A paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (PET/MAH) é definida como uma doença neurológica degenerativa que provoca desmielinização crônica progressiva da medula espinal (Figura 9.5). Exterioriza-se clinicamente como paresia espástica com liberação piramidal, preferencialmente em membros inferiores. Em geral, a doença tem início insidioso, acometendo de 1 a 2% dos portadores de HTLV-I, afetando mais mulheres do que homens, geralmente entre a quarta e quinta décadas de vida.<sup>24</sup> Pode manifestar-se, entretanto, na adolescência, em casos de infecção por transmissão vertical.



**Figura 9.4** Células leucêmicas características da ATL – células em flor, do inglês *flower cells* (400x). Cortesia de Jain e Prabhash, 2010.<sup>26</sup>



**Figura 9.5** Desmielinização medular provocada pelo vírus HTLV-I. **A.** Indivíduo sadio. **B.** Paciente com PET/MAH. Cortesia de Montanheiro, 2007.<sup>27</sup>

O quadro paraparético é comumente acompanhado de distúrbios esfincterianos (retenção urinária e/ou fecal), distúrbios sensoriais discretos, dificuldades para deambular e intensa fraqueza muscular.<sup>14</sup> Na investigação diagnóstica complementar dos pacientes acometidos pela PET/MAH, encontram-se, ainda, reações imunológicas positivas para infecção por HTLV-I também no liquor. A evolução lenta e progressiva do quadro neurológico pode provocar incapacidade física, com restrição à cadeira de rodas em alguns casos.

## ► Epidemiologia

### ▪ Infecções por HTLV no mundo

As infecções pelos vírus HTLV-I e HTLV-II têm sido descritas em diversas regiões do mundo, com variações significativas de soroprevalência de acordo com a área geográfica, o grupo étnico e o comportamento de risco da população. Em geral, dados de prevalência de infecção por HTLV-I/II no mundo são obtidos em inquéritos epidemiológicos entre candidatos a doador de sangue, gestantes, indivíduos com sintomas relacionados com a infecção viral e seus parentes, populações nativas e usuários de drogas ilícitas injetáveis (UDI). Há poucos relatos de taxas de prevalência na população geral.

O HTLV-I tem distribuição geográfica esparsa, com soroprevalências mais elevadas em populações de ilhas do sul do Japão (18% da população adulta apresenta anticorpos anti-HTLV-I circulantes);<sup>28</sup> em ilhas do Pacífico, como Melanésia e Austrália (1,7 a 14%);<sup>29,30</sup> nas regiões central e ocidental da África (Camarões, Costa do Marfim e Moçambique) (1 a 10%);<sup>31,32</sup> nas Américas Central e do Sul;<sup>33</sup> e, ainda, em ilhas do Caribe (3,9% em negros de Trinidad-Tobago,<sup>34</sup> 4,25% em Barbados, 5 a 6% na Jamaica)<sup>35</sup> (Figura 9.6). As maiores taxas de infecção ocorrem entre indivíduos com menor condição socioeconômica e escolaridade, e aumentam progressivamente com a idade desses indivíduos.

Já o HTLV-II tem sido encontrado entre UDI (1 a 50%), tanto de regiões urbanas dos EUA<sup>37</sup> como de países europeus<sup>38</sup> e da América do Sul,<sup>39,40</sup> sendo também prevalente em nativos da África, pigmeus da República de Camarões e Zaire<sup>41,42</sup> e em populações indígenas das Américas do Norte e do Sul,<sup>43</sup> com taxas que variam de 5 a 30%: índios Seminoles na Flórida,<sup>46</sup>



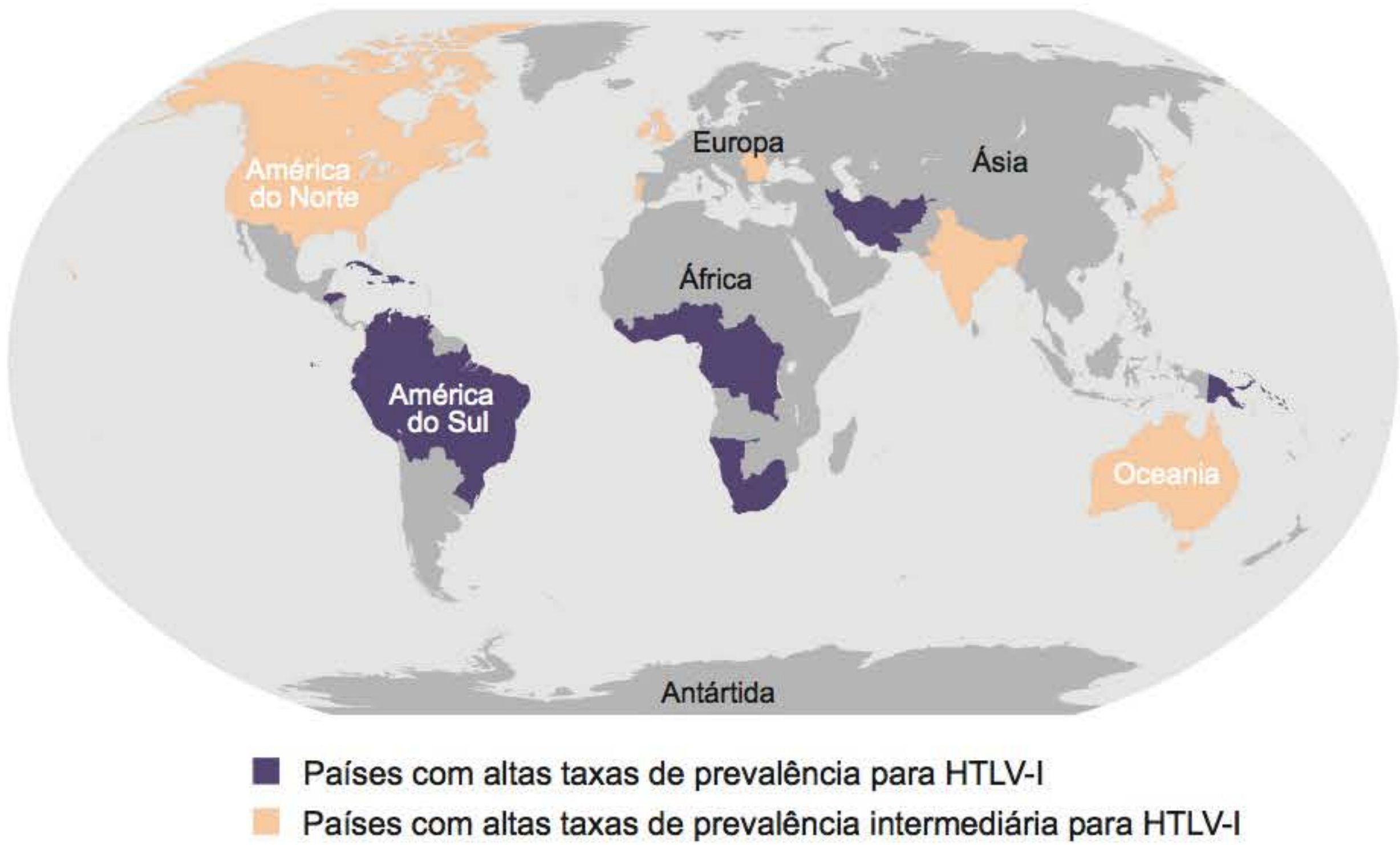


Figura 9.6 Epidemiologia global do HTLV-I. Adaptada de Proietti, 2010.<sup>36</sup>

Navajos e Pueblos no Novo México;<sup>47</sup> índios Guaymis no Panamá;<sup>48</sup> índios Caiapós e Krahos no Brasil; índios Wayuus e Tunebos na Colômbia;<sup>50</sup> índios Tobas e Matacos na Argentina<sup>51</sup> e em índios Pume na Venezuela.<sup>52</sup>

■ Infecções por HTLV no Brasil

Estimativas com base em estudos de soroprevalência em doadores de sangue e em população geral apontam o Brasil como o país com o maior número absoluto de indivíduos soropositivos para HTLV-I/II no mundo, com cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas.<sup>36</sup>

O HTLV-I foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1986, em imigrantes japoneses provenientes de Okinawa, que residiam na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.<sup>53</sup>

Desde então, diversos inquéritos epidemiológicos apontam as Regiões Norte e Nordeste como as que apresentam maior número de infectados por HTLV-I/II no país.

Estudo realizado com doadores de sangue de várias cidades do Brasil mostrou que a maior prevalência da infecção por HTLV-I/II foi encontrada no Maranhão (10/1.000) e a menor, em Santa Catarina (0,4/1.000).<sup>54</sup> A cidade de Salvador, na Bahia, apresenta a maior prevalência de infecção por HTLV-I na população geral (1,3 a 1,8%),<sup>55</sup> sendo esta atribuída à concentração de população negra, descendente de escravos africanos, encontrada naquela localidade. Já o HTLV-II apresenta alta prevalência na Amazônia brasileira, principalmente em população indígena, e em UDI de áreas urbanas de todo o país, principalmente os infectados pelo HIV-1 (Quadro 9.1).

Quadro 9.1 - Prevalência de infecção por HTLV-I/II descritas em alguns estudos conduzidos com diferentes populações das várias regiões do Brasil.

Região	Cidade (UF)	População	N	Prevalência	Diagnóstico	Fonte
Sul	Florianópolis (SC)	Doadores de sangue	1.200	0,08% (HTLV-I)	WB	Galvão-Castro <i>et al.</i> <sup>57</sup>
	Londrina (PR)	HIV+/HIV+UDI	758/57	0,8%/7% (HTLV-I) 4,9%/43,8% (HTLV-II)	WB	Morimoto <i>et al.</i> <sup>58</sup>
Centro-Oeste	Campo Grande (MS)	Imigrantes japoneses	147	6,8% (HTLV-I)	—	Kitagawa <i>et al.</i> <sup>53</sup>
	Estado do MS	Gestantes	32.512	0,1% (HTLV-I/II)	WB/PCR	Figueiró-Filho <i>et al.</i> <sup>59</sup>
	Campo Grande (MS)	Gestantes	116.689	0,13% (HTLV-I/II)	WB/PCR	Dal Fabbro <i>et al.</i> <sup>60</sup>
Sudeste	São Paulo (SP)	Doadores de sangue	17.063	0,15% (HTLV-I) 0,03% (HTLV-II)	WB/PCR	Ferreira <i>et al.</i> <sup>61</sup>
	Rio de Janeiro (RJ)	Doadores de sangue	1.200	0,33% (HTLV-I)	WB	Galvão-Castro <i>et al.</i> <sup>57</sup>
	São Paulo (SP)	Doadores de sangue	351.639	0,3% (HTLV-I/II)	WB	Segurado <i>et al.</i> <sup>62</sup>
	São Paulo (SP)	Doadores de sangue	18.169	0,1% (HTLV-I) 0,07% (HTLV-II)	WB	Sabino <i>et al.</i> <sup>63</sup>
	São Paulo (SP)	HIV+/HIV+UDI	533/89	4%/11,2% (HTLV-I) 6,1%/16,8% (HTLV-II)	WB	Caterino-de-Araujo <i>et al.</i> <sup>64</sup>
	Botucatu (SP)	Gestantes	913	0,1% (HTLV-I)	WB	Olbrich Neto e Meira <sup>65</sup>
	Santos (SP)	HIV+/HIV+UDI	499/119	6%/15,9% (HTLV-I) 7,4%/21% (HTLV-II)	WB	Etzel <i>et al.</i> <sup>66</sup>

Continua



**Quadro 9.1 - Prevalência de infecção por HTLV-I/II descritas em alguns estudos conduzidos com diferentes populações das várias regiões do Brasil (continuação).**

Região	Cidade (UF)	População	N	Prevalência	Diagnóstico	Fonte
Nordeste	Recife (PE)	Doadores de sangue	1.200	0,33% (HTLV-I)	WB	Galvão-Castro <i>et al.</i> <sup>57</sup>
	Salvador (BA)	UDI	216	25,12% (HTLV-I) 10,08% (HTLV-II)	WB	Dourado <i>et al.</i> <sup>67</sup>
	Salvador (BA)	Gestantes	6.754	0,84% (HTLV-I)	WB/PCR	Bittencourt <i>et al.</i> <sup>68</sup>
	Salvador (BA)	População geral	1.385	1,76% (HTLV-I)	WB	Dourado <i>et al.</i> <sup>55</sup>
	João Pessoa (PB)	Lactantes	1.033	0,68% (HTLV-I)	PCR	Pimenta <i>et al.</i> <sup>69</sup>
Norte	Belém (PA)	População geral	-	1,61% (HTLV-I/II)	-	Carneiro-Proietti <i>et al.</i> <sup>70</sup>
	Kubenskore (AM/PA)	Tribo indígena	107	37,4% (HTLV-II)	WB/PCR	Ishak <i>et al.</i> <sup>71</sup>
	Belém (PA)	HIV+	117	1,71% (HTLV-I) 3,42% (HTLV-II)	PCR	Laurentino <i>et al.</i> <sup>72</sup>

Adaptado de Costa, 2010.<sup>56</sup>

## ■ Mecanismos de transmissão

Os HTLV são transmitidos pelo contato com sangue contaminado, por meio da transfusão de hemocomponentes celulares, por relação sexual, mais eficazmente do homem infectado para sua parceira, e, principalmente, pelo aleitamento materno prolongado, com transmissão vertical (de mãe para filho) ou transmissão horizontal (mães de leite).

Em populações endêmicas, os modos de transmissão vertical e sexual são as mais frequentes vias de aquisição desses vírus, e em UDI, principalmente infectados pelo HIV, pelo uso compartilhado de agulhas e seringas contaminadas.

O risco de transmissão transfusional de HTLV-I ou HTLV-II é estimado em aproximadamente 60%, o que torna a triagem sorológica dessa infecção uma etapa crucial para garantir a segurança dos procedimentos hemoterápicos.<sup>73</sup> Desse modo, atento ao risco de transmissão sanguínea, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil, em sua Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993, tornou obrigatória a triagem sorológica da infecção por HTLV em candidatos a doador, por meio da pesquisa de anticorpos anti-HTLV-I/II em bancos de sangue de todo o país.<sup>74</sup> A janela imunológica na infecção por HTLV-I adquirido por via transfusional é de 51 dias (36 a 72 dias; intervalo de confiança de 95%), porém a do HTLV-II é desconhecida.

No estado do Mato Grosso do Sul, desde 2002, foi instituído o Programa de Proteção à Gestante, que inclui a solicitação de teste sorológico para HTLV-I/II no pré-natal como estratégia para controle de transmissão materno-infantil dessa infecção viral.<sup>59</sup> Em Minas Gerais, a Lei nº 17.344 dispõe que os serviços de saúde pública devem realizar testes sorológicos para o diagnóstico de infecção por HTLV-I/II em casos com sintomatologia clínica sugestiva e em todas as gestantes no pré-natal. Inclui ainda, o aconselhamento clínico e familiar, bem como o tratamento do infectado.<sup>75</sup>

## ► Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-I ou II é recomendado nas seguintes situações clínicas:

- Diante de um paciente que apresente sintomas e/ou sinais sugestivos de ATL ou PET/MAH, para confirmação da hipótese diagnóstica clínica

- Na triagem diagnóstica de indivíduos expostos aos HTLV, como, por exemplo, em comunicantes familiares ou parceiros sexuais de portadores dessas infecções
- Na triagem compulsória de doadores assintomáticos de sangue ou órgãos
- No rastreamento de gestantes durante o pré-natal com vistas à prevenção da transmissão vertical.

Considerando que a prevalência da infecção pelos agentes pesquisados varia sensivelmente nas diferentes situações anteriormente enumeradas, cabe enfatizar que o valor preditivo dos testes diagnósticos também será distinto, exigindo sempre a realização de testes confirmatórios para correta elucidação do estado sorológico do indivíduo pesquisado.

Basicamente, o diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-I/II se dá pela detecção de anticorpos específicos, voltados a constituintes antigênicos das diferentes porções do vírus (*core* e *envoltório*) no soro/plasma e/ou pela pesquisa de segmentos de DNA proviral em células do sangue periférico. Em vista dos prognósticos muito diferentes associados às infecções por HTLV-I e II, é fundamental que os testes diagnósticos sejam capazes de distinguir a infecção pelos dois vírus, no contexto de confirmação sorológica, de aconselhamento ao infectado e na prática da rotina clínica.<sup>76</sup>

## ■ Testes de triagem sorológica

Como até a presente data não foram descritas evidências sorológicas de clareamento viral, a presença de anticorpos anti-HTLV significa persistência de infecção por esses vírus, apresentando, portanto, valor diagnóstico.

Os testes de aglutinação de partículas (PA), que pesquisam anticorpos encontrados no soro de indivíduos infectados, têm sido utilizados em inquéritos epidemiológicos e, em alguns países, como testes de triagem e confirmatório, simultaneamente. No Japão, onde a infecção por HTLV-I é endêmica, a utilização da reação de PA mostra-se suficiente, em razão da sua alta sensibilidade, rapidez e facilidade de execução<sup>77</sup> (Figura 9.7).

Os ensaios imunoenzimáticos (EIA ou ELISA) também são úteis para detectar anticorpos anti-HTLV. Em 1988, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA licenciou o primeiro *kit* de EIA para a detecção de anticorpos dirigidos ao HTLV-I.<sup>78</sup> Desde então, os EIA passaram por várias modifi-



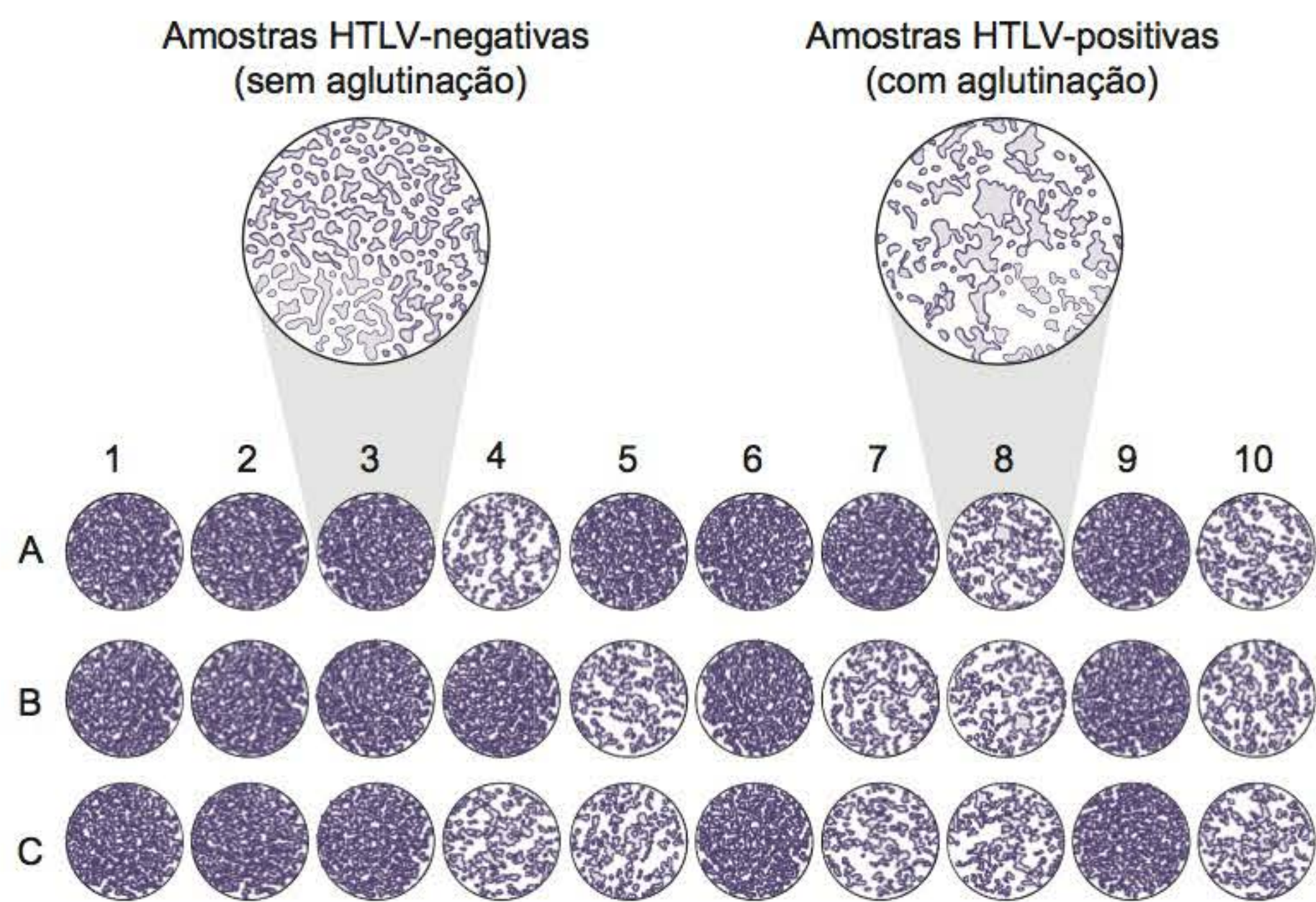


Figura 9.7 Reação de aglutinação em placa de microtitulação.

cações em sua composição antigênica e formato, com vistas a aprimorar sua sensibilidade e especificidade para detectar infecção por HTLV-II.<sup>79</sup>

Os testes EIA iniciais continham lisado viral de HTLV-I (1ª geração) e a semelhança entre os genomas do HTLV-I e II possibilitava sua utilização na triagem sorológica da infecção por HTLV-II.<sup>80</sup> No entanto, a sensibilidade não se mostrava adequada, apesar de haver sororreatividade cruzada entre ambos os tipos de HTLV. Assim, esses testes foram substituídos por ensaios que, além do lisado viral de HTLV-I, continham proteínas recombinantes e/ou peptídios sintéticos de HTLV-I e II (2ª geração) em seu substrato antigênico. Mais recentemente foram desenvolvidos testes no formato sanduíche, que contêm apenas proteínas recombinantes e peptídios sintéticos de HTLV-I e HTLV-II (3ª geração) (Quadro 9.2).

Mesmo após essas modificações, vários estudos conduzidos na América do Sul apontaram deficiências dos EIA comercialmente disponíveis no comércio para a detecção principalmente de HTLV-II, na maioria, em pacientes com HIV/AIDS.<sup>40,82-84</sup>

Testes confirmatórios

Dado que os métodos de triagem sorológica para HTLV-I/II citados anteriormente apresentam deficiências e frequentes resultados falso-positivos, o diagnóstico confirmatório dessas retrovirose faz-se necessário.

Ainda, como o diagnóstico discriminatório entre o HTLV-I e o HTLV-II é de suma importância para o aconselhamento e direcionamento da conduta clínica frente ao paciente, em países em que ambos são endêmicos e onde os isolados virais

Quadro 9.2 - Descrição das modificações ocorridas na composição antigênica e formato de alguns kits de EIA utilizados na triagem sorológica da infecção por HTLV-I/II ao longo do tempo.

Geração	Kits	Antígeno	Conjugado/substrato
EIA 1ª (1991)	RETROTEK HTLV-I	Lisado viral de HTLV-I	Anti-IgG Fosfatase/NPP
	HEMOBIO anti-HTLV-I	Lisado viral de HTLV-I	Anti-IgG Peroxidase/TMB
	PLATELIA® HTLV-I	Lisado viral de HTLV-I	Anti-IgG e anti-IgM Peroxidase/OPD
EIA 2ª (1992)	UBI HTLV-I + II	Peptídio sintético Env HTLV-I e II	Anti-IgG Peroxidase/OPD
	VIRONOSTIKA® HTLV-I/II	Lisado viral de HTLV-I e II + p21E de HTLV-I	Anti-IgG Peroxidase/TMB
EIA 2ª (1995)	HEMAGEN HTLV-I + II	Lisado viral de HTLV-I + gp46 e p21E	Anti-IgG e anti-IgM Peroxidase/TMB
EIA 2ª (2006)	BioELISA HTLV-I + II	Antígenos recombinantes de HTLV-I e II	Anti-IgG e anti-IgM Peroxidase/OPD
EIA 3ª (1999)	ORTHO® HTLV-I/HTLV-II	Antígenos recombinantes (Env/core) de HTLV-I e II	Proteínas recombinantes <sub>Env/core</sub> Peroxidase/OPD
EIA 3ª (1999)	MUREX® HTLV-I + II	Peptídio sintético gp46 de HTLV-I e II + gp21 HTLV-II	gp46 HTLV-I e II + gp21 HTLV-I Peroxidase/TMB

Adaptado de Caterino-de-Araujo, 2008.<sup>81</sup>



podem divergir dos isolados empregados na composição dos kits utilizados, há necessidade de se verificar qual o melhor teste confirmatório para ser utilizado no diagnóstico.

### Testes confirmatórios sorológicos

Amostras reagentes à triagem de infecção por HTLV podem ser confirmadas por diversos ensaios sorológicos, tais como *Western blot* (WB), imunofluorescência indireta (IFI), radioimunoprecipitação (RIPA) ou imunoensaio de linha (INNO-LIA), ou até mesmo, por imunoquimioluminescência (ARCHITECT rHTLV-I/II).

O teste de IFI para pesquisa de HTLV baseia-se na incubação dos soros a serem testados com antígenos dos vírus em células infectadas fixadas em lâminas de vidro e visualizadas por leitura em microscópio de fluorescência. Embora seja um teste de baixo custo, cuja sensibilidade e especificidade são altas, apresenta problemas operacionais, que dificultam sua utilização na rotina diagnóstica, como:

- Necessidade de manutenção de linhagens celulares infectadas por HTLV
- Necessidade de equipamentos especiais como microscópio de fluorescência
- Cabines e salas com níveis de biossegurança 2 e 3
- Técnicos altamente treinados para a leitura do ensaio.

Ainda, em uma reação positiva, o resultado indica apenas a presença de anticorpos contra HTLV, sem distinguir se foram induzidos por infecção causada por HTLV-I ou HTLV-II. Já o ensaio de RIPA é cada vez menos utilizado na rotina diagnóstica, particularmente em razão do emprego de isótopos radioativos, apesar de ser um método bastante sensível e específico.

Outro método promissor, recentemente desenvolvido para o diagnóstico confirmatório de infecção pelos HTLV, baseia-se no princípio de imunoquimioluminescência. O ARCHITECT rHTLV-I/II é um sistema automatizado para detecção de anticorpos anti-HTLV-I/II, que utiliza proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos com método imunoenzimático tipo duplo

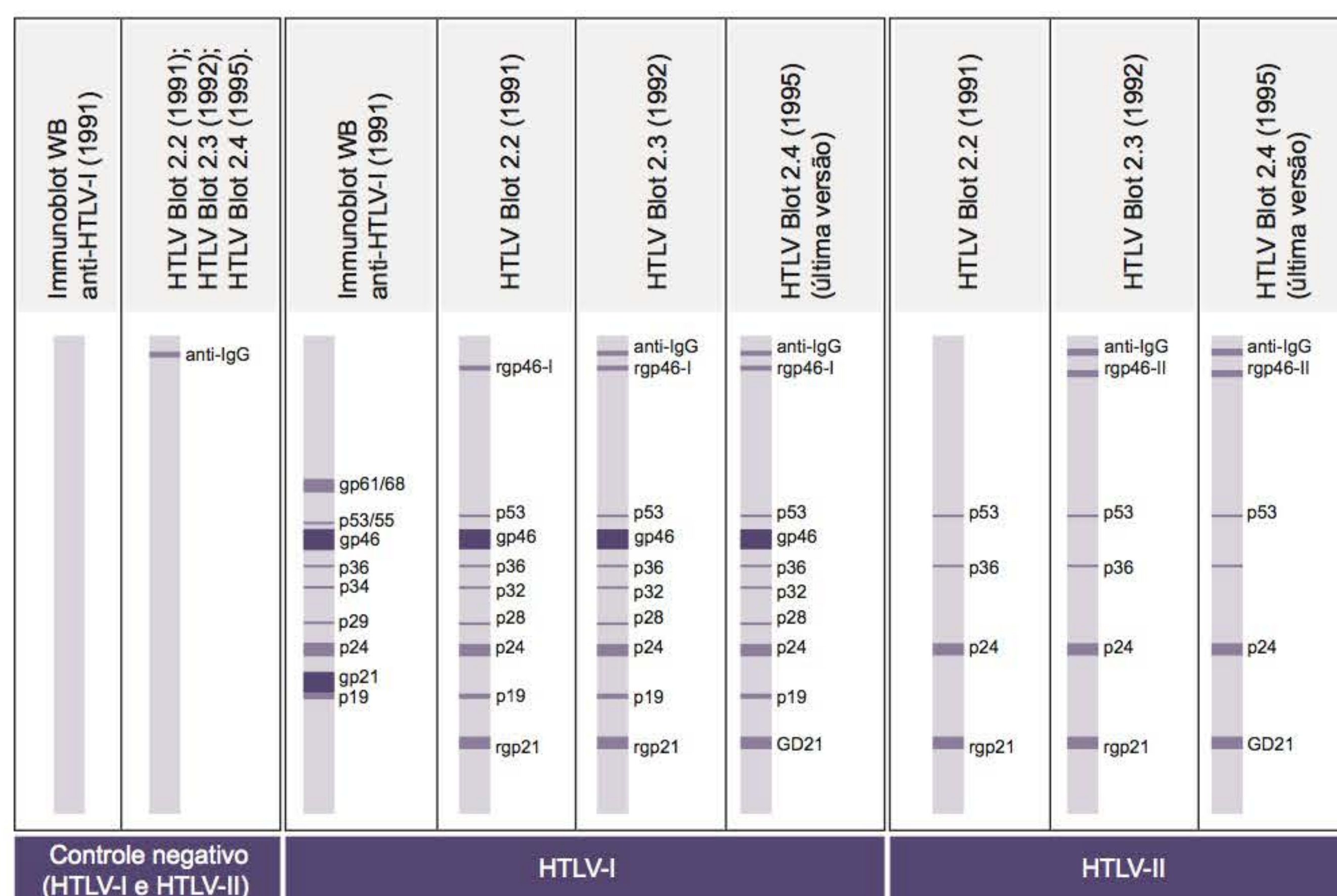
sanduíche. Estudos preliminares mostram que o teste é altamente sensível e específico.<sup>85</sup>

Embora todas as técnicas empregadas apresentem limitações e não haja um teste padrão-ouro para o diagnóstico confirmatório de infecção por HTLV-I/II, o ensaio de WB destaca-se como o teste mais utilizado no Brasil e no mundo.

Assim como os EIA, os testes confirmatórios de WB têm sido modificados com o passar dos anos. Ao WB foram incorporadas glicoproteínas recombinantes do envelope do HTLV-I e HTLV-II (MTA-1/rgp46-I e K-55/rgp46-II, respectivamente), bem como a proteína recombinante transmembrana GD21 compartilhada entre HTLV-I e HTLV-II, o que acarretou menor frequência de reações inespecíficas, reduzindo o número de resultados falso-positivos encontrados e conferindo maior especificidade ao teste (Figura 9.8).<sup>86,87</sup>

No entanto, mesmo após tais modificações, diversos estudos têm mostrado que a última versão do WB (HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics, Singapore), ainda apresenta um grande percentual de resultados soroindevidados,<sup>40,88,89</sup> em frequências variando de 0,5% entre doadores de sangue a 7,05% em população de risco.<sup>90,91</sup> Esses achados chegam a ser mais frequentes do que os resultados comprovadamente positivos, tanto em países localizados em regiões não endêmicas, como nos EUA (0,027% positivos e 0,14% indeterminados),<sup>92</sup> como também em regiões consideradas endêmicas, tais como o Brasil (0,03% positivos e 0,14% indeterminados)<sup>62</sup> e outros países do Caribe, Guadalupe (0,2% positivos e 0,4% indeterminados)<sup>93</sup> e Martinica (0,4% positivos e 0,5% indeterminados).<sup>90</sup> Na África, estudos conduzidos na República de Camarões já mostraram taxas populacionais de sororeatividade indeterminada iguais ou superiores a 11%.<sup>94,95</sup>

O ensaio de WB para HTLV-I/II anteriormente citado, além de teste diagnóstico confirmatório, serve também como teste discriminatório, pois pesquisa anticorpos circulantes voltados para epitopos não compartilhados entre os dois tipos de HTLV, possibilitando assim identificar o tipo viral responsável pela infecção. Os antígenos virais utilizados são obtidos a partir de culturas de

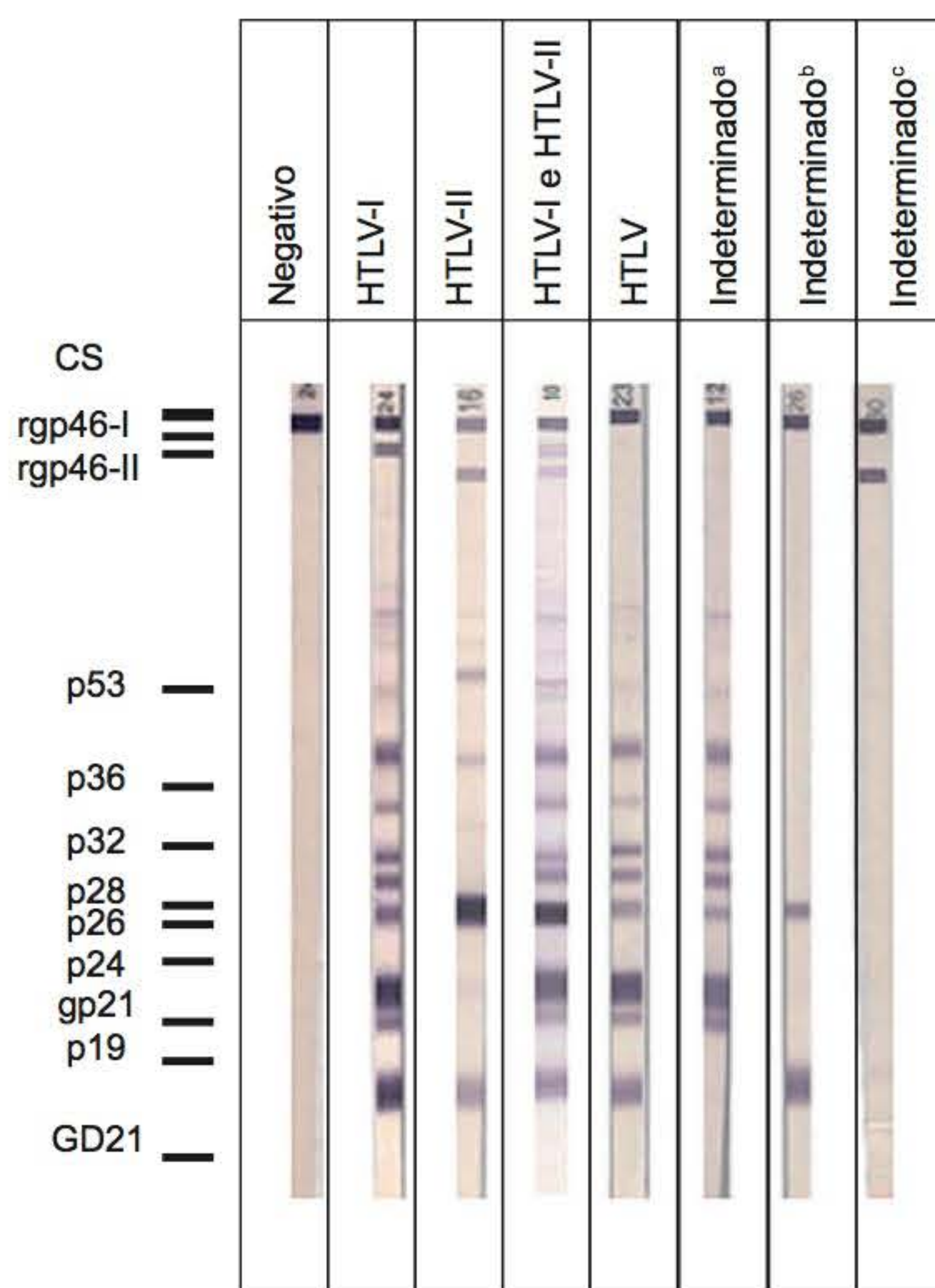


**Figura 9.8** Esquema das modificações ocorridas na composição antigênica do ensaio de *Western blot* utilizado na confirmação sorológica da infecção por HTLV-I/II ao longo do tempo. Adaptada de Caterino-de-Araujo, 2008.<sup>81</sup>



células infectadas, que, por meio de uma eletroforese em gel de poliácridamida, têm suas respectivas proteínas virais separadas de acordo com seu peso molecular. Esse material é, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose, que é cortada em tiras. A análise por WB é, na verdade, uma variação da reação de ELISA: quando expostas ao soro do paciente infectado, as proteínas imobilizadas capturam os anticorpos específicos do vírus, e essa ligação pode ser visualizada com um anticorpo anti-humano conjugado a uma enzima. A técnica revela as proteínas reconhecidas pelo soro do paciente e a sororreatividade aos antígenos tipo-específicos distingue os indivíduos infectados por HTLV-I daqueles infectados por HTLV-II. Porém, nos casos em que o WB não for capaz de confirmar a infecção pelos HTLV e apresentar resultados indeterminados, ou, ainda, quando não puder identificar o tipo viral responsável pela infecção (padrão HTLV não tipado), há a necessidade de se recorrer às técnicas laboratoriais de biologia molecular para esse fim.<sup>76</sup>

A Figura 9.9 ilustra as bandas que podem ser visualizadas no teste de WB para a pesquisa de infecção por HTLV-I/II e os critérios de interpretação da técnica, segundo recomendações do fabricante do *kit* diagnóstico.



**Figura 9.9** Padrão de reatividade do Western blot (HTLV Blot 2.4, Genelabs), segundo critérios do fabricante. Interpretação dos resultados: Negativo – nenhuma reatividade para as bandas específicas do HTLV-I/II; HTLV-I soropositivo – reatividade para bandas dos genes *gag* (p19 com ou sem a p24) e *env* (GD21 e rgp46-I); HTLV-II soropositivo – reatividade para bandas dos genes *gag* (p24 com ou sem a p19) e *env* (GD21 e rgp46-II); HTLV-I e HTLV-II soropositivo – reatividade para bandas dos genes *gag* (p24 e p19) e *env* (GD21, rgp46-I e rgp46-II); HTLV-positivo, mas não tipado – reatividade para bandas dos genes *gag* (p19 e p24) e *env* (GD21); indeterminado – reatividade para bandas específicas do HTLV, mas não preenchem os critérios de positividade para o HTLV-I ou HTLV-II ou HTLV; amostras representativas de alguns padrões indeterminados – indeterminado<sup>a</sup> – todas as bandas, exceto rgp46-I, rgp46-II e GD21; indeterminado<sup>b</sup> – GD21, p24; indeterminado<sup>c</sup> – GD21 (TL) e rgp46-II; TL – traços leves; CS – controle da qualidade do soro. Adaptada de Costa, 2010.<sup>56</sup>

A elevada frequência de resultados indeterminados pelo WB acarreta intensa insegurança para o paciente e seus familiares. Além disso, compromete significativamente, sob o ponto de vista epidemiológico, a estimativa da prevalência de infecção por HTLV-I/II na população e, sob o ponto de vista clínico, o aconselhamento e a assistência ao paciente.

Embora estudos conduzidos em áreas não endêmicas para a infecção por HTLV tenham demonstrado que padrões indeterminados ao WB, em geral, não correspondem a casos verdadeiramente positivos à infecção,<sup>96</sup> o mesmo parece não ocorrer em regiões endêmicas ou em populações mais suscetíveis à infecção.<sup>40,97,98</sup>

Amostras soroindeterminadas ao WB com resultados comprovadamente negativos à infecção pelos HTLV, quando submetidas a outros testes confirmatórios (sorológicos e/ou moleculares), podem ser decorrentes de reatividade cruzada por coinfeção com outros vírus e/ou parasitas.<sup>99–101</sup> Resultados indeterminados podem ainda ser decorrentes de infecções por cepas variantes de HTLV que apresentam mutações genômicas em segmento(s) do DNA proviral que codificam os peptídeos imunodominantes contidos no substrato antigênico do teste.<sup>102,103</sup> Por outro lado, amostras indeterminadas ao WB que resultam positivas nos testes moleculares podem representar casos de infecção recente, ainda em fase de soroconversão.<sup>90</sup>

Para minimizar as limitações do WB, um teste semelhante foi desenvolvido posteriormente, o *Immunoblot*, com a vantagem de conter apenas proteínas específicas, e, por isso, apresenta melhor poder discriminatório, com menor percentual de resultados indeterminados.<sup>63,104</sup> No entanto, sua utilização tem sido raramente descrita, pois, assim como o WB, tem custo bastante elevado.

### Diagnóstico molecular

A pesquisa de genomas (pro)virais por testes moleculares vem se tornando a principal ferramenta para a detecção e a identificação de diversos vírus em laboratórios de todo o mundo. Sendo assim, como nova alternativa para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelos HTLV, ensaios moleculares de amplificação genômica como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real têm sido utilizados.<sup>88,105–107</sup> Além disso, as reações de PCR também têm sido úteis no diagnóstico precoce da transmissão materno-infantil, pois, nesses casos, os resultados das provas sorológicas sofrem interferência da transferência passiva de anticorpos maternos. A detecção da infecção na fase de soroconversão após infecção recente também pode ser realizada com base nos testes moleculares.<sup>108</sup>

As técnicas de biologia molecular empregadas com finalidade diagnóstica pesquisam DNA proviral em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma vez que os HTLV não apresentam significativa viremia plasmática.<sup>109</sup>

Os ensaios da PCR (convencional e em tempo real) baseiam-se na amplificação exponencial de segmentos genômicos do DNA proviral. Na reação com finalidade diagnóstica, têm-se utilizado iniciadores (*primers*) consensuais relacionados com regiões mais conservadas do genoma proviral (*pol* e/ou *tax*), capazes de amplificar sequências tanto de HTLV-I como de HTLV-II. No caso da PCR em tempo real utilizam-se na reação sondas luminescentes (no sistema de detecção TaqMan) ou corantes, que se ligam à fita dupla de DNA (no sistema de detecção SYBR Green), possibilitando que se detecte o produto da amplificação no próprio equipamento em que o ensaio está sendo realizado. Na PCR convencional, após a amplificação,



há necessidade de submeter as amostras a eletroforese em suporte sólido (gel de agarose ou poliácridamida) para posterior adição das sondas e revelação dos *amplicons*.

Por outro lado, se o interesse é identificar subtipos virais, os segmentos genômicos de HTLV com maior variabilidade genética (*LTR* e *env*) são escolhidos para a amplificação pela PCR.<sup>110-113</sup>

Os testes moleculares são altamente sensíveis e específicos, com maior sensibilidade da PCR em tempo real. Todavia, o desempenho dessa técnica depende diretamente da carga proviral de HTLV encontrada nas amostras testadas.<sup>97,114</sup> Com a finalidade de aumentar a sensibilidade da PCR convencional, em alguns casos pode-se optar pelo emprego da técnica de *nested* PCR, que consiste em uma segunda amplificação genômica, a qual utiliza como molde o produto de amplificação inicial e um par de iniciadores, localizado internamente à sequência do par de iniciadores consensuais empregado na primeira amplificação. Contudo, esse ensaio adicional consome tempo e apresenta alto risco de contaminação. Por outro lado, em ambas as reações de PCR (convencional e em tempo real), é fundamental incluir controles internos de reação, como, por exemplo, iniciadores para sequências genômicas de células eucarióticas ( $\beta$ -globina, HLA), que tornam possível verificar as condições de amplificação, minimizando os riscos de se obterem resultados falso-negativos.

Para distinguir as infecções por HTLV-I e/ou por HTLV-II, utilizam-se técnicas de hibridação com sondas específicas marcadas,<sup>115</sup> ou, ainda, a análise de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição enzimática (RFLP), após digestão dos produtos da PCR por endonucleases, que produzem fragmentos tipo-específicos.<sup>40,73,116</sup> Contudo, para minimizar etapas, em vez de se utilizarem iniciadores consensuais, a PCR pode também ser executada, empregando-se iniciadores específicos, capazes de amplificar exclusivamente segmentos de HTLV-I ou HTLV-II em cada reação. Nessa situação, o diagnóstico diferencial depende apenas da visualização dos produtos da PCR diretamente por eletroforese em suporte sólido.

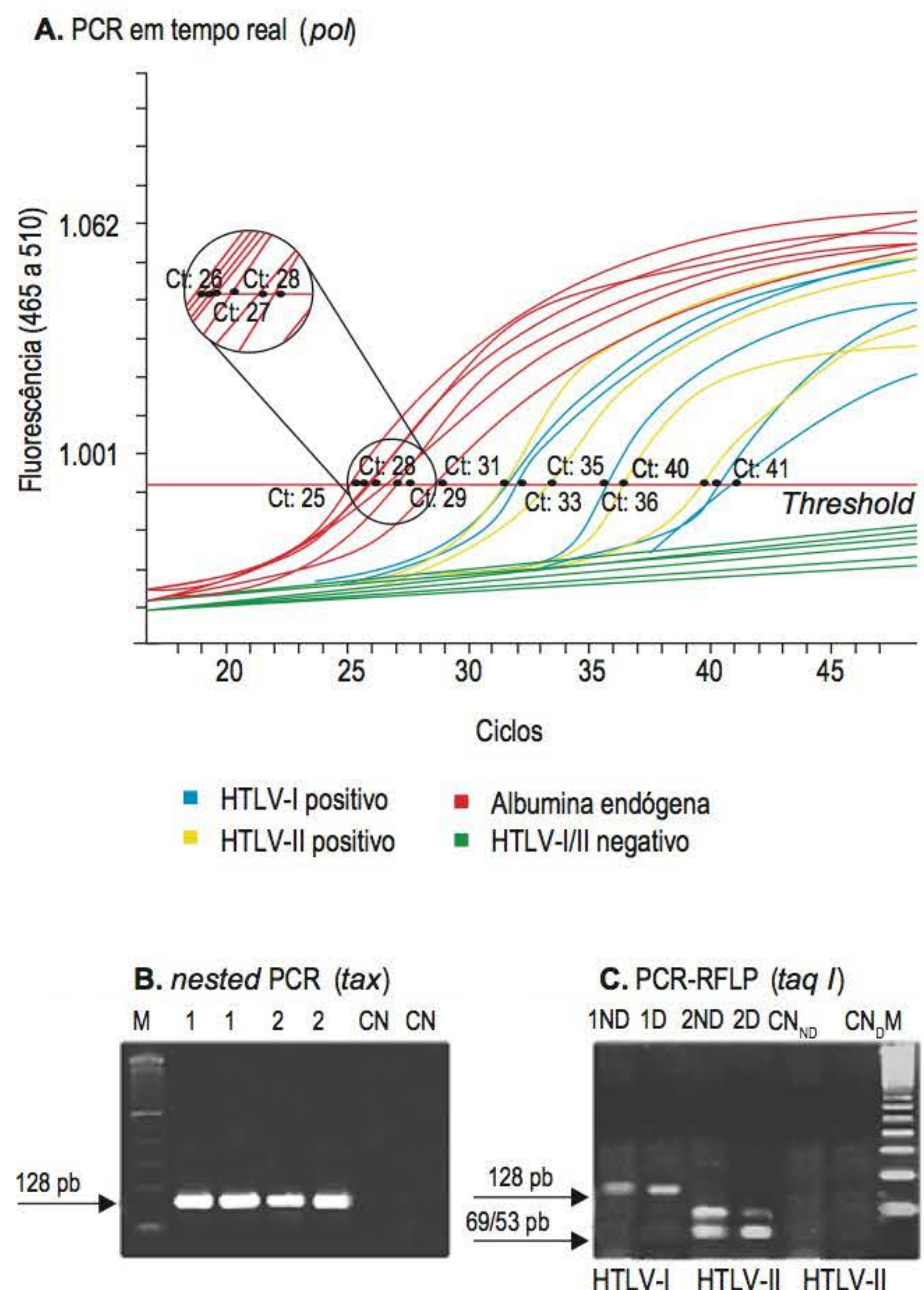
A Figura 9.10 mostra um gráfico de amplificação de uma reação de PCR em tempo real para a detecção do segmento genômico *pol* dos HTLV-I e HTLV-II e de albumina humana, utilizada como controle endógeno de reação (A) e apresenta os produtos de amplificação da *nested* PCR (B), seguida de RFLP (C), ambas para a região *tax* dos HTLV.

No Brasil, em vista do alto custo do teste de WB e do elevado número de soros com padrão inconclusivo (indeterminado ou HTLV não tipado), diversos protocolos de PCR têm sido propostos. No entanto, carecem de padronização quanto ao segmento proviral pesquisado e quanto aos iniciadores e sondas empregados.<sup>40,72,88,97,118-121</sup>

A escassez de estudos multicêntricos que utilizam esses testes no país dificulta a comparação dos resultados obtidos.

### Algoritmos de testes laboratoriais para o diagnóstico

O Ministério da Saúde do Brasil (1998) recomenda dois algoritmos para o diagnóstico de infecção por HTLV-I/II, de modo a contemplar as necessidades dos bancos de sangue e dos laboratórios de diagnóstico, que diferem entre si. Nas unidades de hemoterapia, as amostras de soro devem ser submetidas a um único teste de EIA que contenha antígenos específicos de HTLV-I e HTLV-II. Quando apresentam resultados reagentes ou indeterminados devem ser retestadas em duplicata, utilizando-se o mesmo *kit* de EIA e, em caso de novamente resultarem reagentes e/ou indeterminadas, devem determinar a exclusão do doador. Em laboratórios de diagnóstico, após a



**Figura 9.10** Testes moleculares empregados no diagnóstico confirmatório de infecção por HTLV-I/II. **A.** Curvas de amplificação da PCR em tempo real (*pol*). *Threshold*: valor de fluorescência ideal para discriminar uma amostra positiva de uma negativa na PCR em tempo real; *Ct*: *cycle threshold*. Adaptada de Costa, 2010.<sup>56</sup> **B.** Produtos de amplificação da *nested* PCR (*tax*). **C.** Padrão eletroforético de produtos de amplificação da *nested* PCR (*tax*) antes e após a digestão pela enzima *Taq I* na reação de PCR-RFLP. M: DNA Ladder de 100 pb; CN: duplicata do controle negativo para HTLV-I/II; 1: duplicata do controle positivo para HTLV-I; 2: duplicata do controle positivo para HTLV-II; ND: produto não digerido; D: produto digerido. As setas à esquerda indicam os tamanhos dos produtos amplificados em pares de bases. Adaptada de Caterino-de-Araujo, 2008.<sup>117</sup>

triagem sorológica baseada em EIA e retestagem em duplicata das amostras reagentes e indeterminadas, sugere-se proceder ao teste confirmatório por IFI ou WB, embora o primeiro não esteja disponível comercialmente.

Diversos grupos de pesquisa em HTLV do Brasil e do mundo têm descrito dificuldades em definir o melhor algoritmo laboratorial para diagnóstico de infecção por HTLV, principalmente por HTLV-II, uma vez que dados mostram que nenhum teste de EIA atualmente disponível no comércio (1ª, 2ª ou 3ª geração) é capaz de detectar todos os casos verdadeiramente soropositivos (confirmados por WB e/ou PCR).<sup>40,79,83,91,118,122-128</sup> Corroborando esses achados, estudos com os testes preconizados para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção mostram que nenhum apresenta 100% de eficiência, quando empregado isoladamente, sendo os vários testes, em verdade, complementares entre si.<sup>40,79,88,97</sup>

Em função de tais limitações, estudos para adequar os algoritmos de testes vêm sendo desenvolvidos e novas condutas vêm sendo adotadas. Para atender a população de bancos de



sangue, considerada de baixo risco para a aquisição dos HTLV, em geral a amostra de soro é testada em duplicata por um único teste de EIA que apresente alta sensibilidade (3ª geração). As amostras reagentes e/ou indeterminadas são automaticamente descartadas. Apesar do grande percentual de resultados falso-positivos apresentados pelos EIA de 3ª geração, candidatos à doação de sangue devem ser rigorosamente triados; portanto, o seu uso em duplicata parece ser suficiente. Contudo, a realização dos testes confirmatórios para HTLV é facultativa em bancos de sangue, e aqueles que a fazem, geralmente, utilizam o ensaio de WB ou a PCR. Em sua maioria, os indivíduos sororreagentes são encaminhados a ambulatórios especializados para confirmação diagnóstica e aconselhamento clínico.<sup>63,127,129</sup>

Em contrapartida, populações de risco para aquisição da infecção são assistidas por laboratórios de referência, que têm solicitado uma única amostra de sangue colhida em tubo contendo anticoagulante, para possibilitar que a triagem e a confirmação diagnóstica sejam realizadas por ensaios sorológicos e moleculares a partir da mesma amostra. Para a triagem, recomenda-se o emprego de dois testes EIA de composição antigênica e formatos diferentes (2ª e 3ª geração). Embora essa medida não minimize o número de resultados falso-positivos dos EIA de 3ª geração, reduz significativamente o número de resultados falso-negativos. As amostras reagentes em pelo menos um EIA são retestadas em duplicata pelos mesmos testes e as que novamente resultarem reagentes e/ou indeterminadas devem ser submetidas aos testes confirmatórios. Recentemente, foi proposto novo algoritmo de testes confirmatórios para atender essa população, que recomenda o uso da PCR em tempo real como teste confirmatório, reservando a avaliação por WB somente para as amostras negativas à PCR. Essa medida, além de reduzir custos, minimiza consistentemente o percentual de resultados indeterminados observado com o WB. Contudo, somente é factível em laboratórios equipados para realizar a PCR em tempo real.

### Monitoramento da carga proviral

Nas últimas décadas, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) vem sendo empregada na prática clínica para monitorar a carga viral plasmática em casos de infecção pelo HIV e pelos vírus das hepatites B e C. Na infecção pelo HIV, esse marcador, que indica a intensidade da replicação viral, torna possível que seja avaliado o risco de o paciente evoluir para AIDS, bem como sua resposta ao tratamento antirretroviral.<sup>130</sup>

O advento da qPCR possibilitou a introdução da automação na quantificação da carga proviral, o que conferiu reprodutibilidade e precisão de resultados, ampliando o espectro de aplicações dos métodos moleculares e direcionando-os para uma aplicação clínica.<sup>105,107,131,132</sup>

No caso da infecção por HTLV a determinação da carga proviral vem sendo estudada quanto ao seu valor prognóstico no monitoramento de portadores assintomáticos e de pacientes com PET/MAH.<sup>106,133-136</sup> No entanto, assim como a PCR convencional para o diagnóstico, a qPCR também carece de padronização e de estudos multicêntricos.

A carga proviral de HTLV-I/II geralmente é medida em PBMC, sendo expressa em número de cópias por 10<sup>6</sup> PBMC. Esse marcador determina o nível de integração viral nas células hospedeiras, ou seja, a proporção de células infectadas que carregam provírus, possibilitando o acompanhamento periódico da evolução clínica dos pacientes infectados, uma vez que, como um marcador de replicação viral, pode indicar possíveis danos ao hospedeiro em diferentes períodos da infecção.

Sendo assim, poderia representar um marcador de evolução clínica para PET/MAH.

Embora os resultados variem muito de um indivíduo para outro, e, até, no mesmo indivíduo em diferentes períodos da infecção (flutuação da carga proviral),<sup>137</sup> a média da carga proviral de HTLV-I em um portador assintomático é significativamente mais baixa do que em pacientes com ATL e PET/MAH, principalmente nos progressores rápidos (que apresentam cargas 10 a 100 vezes mais elevadas).<sup>136,138-140</sup> Presume-se que o aumento da carga proviral esteja relacionado com a maior resposta inflamatória e, em consequência, com a lesão no sistema nervoso. Entretanto, não há até o momento evidências de que se possa definir um limiar de carga proviral associado a risco de progressão para doença neurológica em coortes de portadores assintomáticos da infecção por HTLV-I. Além disso, relatos mostram que, em geral, após o estabelecimento da doença, a carga proviral pode tornar-se indetectável em pacientes com PET/MAH.<sup>132</sup>

Além de ser determinante na patogênese da PET/MAH, a carga proviral elevada de HTLV-I parece estar associada a outras doenças de caráter inflamatório, como uveítes<sup>141</sup> e artrites.<sup>142</sup> No contexto da ATL, carga proviral aumentada indica um estágio intermediário da doença, frequentemente complicada por infecção oportunista, coma parasitoses (strongiloidíase) e micoses.<sup>22</sup>

Os indivíduos infectados por HTLV-II, ao contrário, exibem habitualmente cargas provirais muito baixas, fato esse atribuído por alguns autores à grande estabilidade genômica desse vírus ou a sua lenta replicação.<sup>131,134</sup> Em contrapartida, em pacientes coinfectados com HIV-I, há relatos que mostram carga proviral de HTLV-II aumentada,<sup>143,144</sup> muito embora haja outro estudo que não corroborou tais achados.<sup>145</sup>

A intensidade da carga proviral do HTLV também tem sido relacionada com a via de aquisição do vírus (sexual ou vertical), sendo mais baixa nos indivíduos que adquiriram a infecção por via sexual.<sup>146</sup>

### Isolamento viral

As técnicas de isolamento viral podem também detectar e identificar o tipo de HTLV responsável pela infecção, embora com menor sensibilidade, quando comparadas aos métodos sorológicos e de amplificação do genoma. O isolamento é revelado pela pesquisa da produção de antígenos virais, utilizando-se EIA para quantificar tais proteínas no sobrenadante da cultura (p24 do HTLV-I/II, por exemplo).<sup>147</sup> Além disso, pode-se buscar a detecção direta de partículas retrovirais nos cultivos, por ultramicroscopia, ou, ainda, pesquisar antígenos virais em células cultivadas *in vitro*, por imunofluorescência direta.

As técnicas que apresentam melhores resultados envolvem o cocultivo de PBMC do paciente a ser testado com linfócitos de indivíduo não infectado, estimulados por mitógenos (fito-hemaglutinina) e fatores de crescimento linfocitário, como a IL-2.<sup>148</sup>

Apesar de ser a mais clássica técnica de diagnóstico virológico e de tornar possível a obtenção e a manutenção do vírus para estudos posteriores, o isolamento viral apresenta limitações operacionais no que se refere a: longo tempo necessário para a obtenção dos resultados; custo elevado, pois requer infraestrutura laboratorial sofisticada com nível de biossegurança adequado para ser executada; problemas de frequente contaminação dos cocultivos por bactérias e/ou fungos; e sensibilidade comprometida em casos de pacientes com baixa carga viral. Considerando tais limitações, sua utilização tem sido restrita a laboratórios de pesquisa, não se aplicando à rotina diagnóstica.



## ► Referências bibliográficas

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci EUA* 1980; 77(12):7415-7419.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M *et al.* A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 1982; 218(4572):571-573.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599):868-871.
- Quackenbush S, Casey J. Phylogenetic relationships within the family. In: Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J *et al.* (editors). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego (CA): Elsevier Academic Press, 8 ed, 2005, p. 439.
- Calattini S, Chevalier SA, Duprez R *et al.* Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2005; 2, 30.
- Wolfe ND, Heneine W, Carr JK *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci EUA* 2005; 102(22):7994-7999.
- Mesnard JM, Barbeau B, Devaux C. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. *Blood* 2006; 108(13):3979-3982.
- Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK *et al.* *In vivo* cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 1990; 64(11), 5682-5687.
- Ijichi S, Ramundo MB, Takahashi H *et al.* *In vivo* cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). *J Exp Med* 1992; 176(1):293-296.
- Hall WW, Kubo T, Iijichi S *et al.* Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Sem Virol* 1994; 5:165-178.
- Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood* 1995; 86:3619-3639.
- Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 2005; 24:5976-5985.
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F *et al.* Clinical diversity in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res* 1985; 45 (suppl):4644-4645.
- Gessain A, Barin F, Vernant J-C *et al.* Antibodies to human T-cell lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; 2:407-410.
- Osame M, Usuku K, Izumo S *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986; 1:1031-1032.
- Kaplan JE, Khabbaz RF. The epidemiology of human T-lymphotropic virus types I and II. *Med Virol* 1993; 33:137-148.
- Orland JR, Engstrom J, Frider J *et al.* Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV outcomes study. *Neurology* 2003; 61:1588-1594.
- Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LMI *et al.* Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) simile diagnosis in HIV-1-coinfected subjects. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2006; 48:207-210.
- Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J Clin Exp Hematop* 2010; 50(1):1-8.
- Umehara F, Izumo S, Ronquillo AT *et al.* Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53(1):72-77.
- Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* 2009; 6:71.
- Martins ML, Martins CPS, De Carvalho LD *et al.* HTLV Cadernos Hemominas. Minas Gerais: Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 5 ed, v. 15, 2010, p. 30-59.
- Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV/Human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS* 2009; 11:8-16.
- Osame M, Matsumoto M, Usuku K *et al.* Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T lymphotropic virus type I and adult T cell leukemia like cells. *Ann Neurol* 1987; 21:117-122.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K *et al.* Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. *Blood* 1977; 50:481-492.
- Jain P, Prabhash K. Flower cells of leukemia. *Blood Work Images in Hematology* 2010; 115:1668.
- Montanheiro PA. Quantificação da carga proviral de HTLV-1 e marcadores imunológicos em indivíduos portadores e pacientes com PET/MAH. [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2007. 64 pp.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC *et al.* Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005; 24(39):6058-6068.
- Lopes MSSN, Carneiro-Proietti ABF. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008; 30(3):229-240.
- Yanagihara R, Garruto RM, Miller MA *et al.* Isolation of HTLV-I from members of a remote tribe in New Guinea. *N Engl J Med* 1990; 323:993-994.
- Goubau P, Liu H-F, De Lange GG *et al.* HTLV-II seroprevalence in pygmies across Africa since 1970. *AIDS Res Hum Retrovirol* 1993; 9:709-713.
- Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Costa EAS *et al.* Prevalence of Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV-1/2) in Individuals from Public Health Centers in Mozambique. *AIDS Res Hum Retrovirol* 2010; 26(5):559-561.
- Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM *et al.* HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 19(1):44-53.
- Bartholomew C, Cleghorn F, Blattner WA. The clinical spectrum of HTLV-I infection in Trinidad and Tobago. In: Blattner WA (ed.). *Human Retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press, 1990; p. 237-44.
- Wattel E, Mariotti M, Agis F *et al.* Human T lymphotropic virus (HTLV) type I and II DNA amplification in HTLV-I/II-seropositive blood donors of the French West Indies. *J Infect Dis* 1992; 165:369-372.
- Proietti ABFC. HTLV Cadernos Hemominas, Minas Gerais: Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 5 ed., v. 15, 2010, p. 92.
- Hall WW, Ishak R, Zhu SW *et al.* Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties and clinical features of infection. *J Acq Imm Def Synd Hum Retrovirol* 1996; 13:S204-S214.
- Zanetti AR, Galli C. Seroprevalence of HTLV-I and HTLV-II. *N Engl J Med* 1992; 326:1783-1784.
- Berini CA, Pando MA, Bautista CT *et al.* HTLV-1/2. Among high-risk groups in Argentina: molecular diagnosis and prevalence of different sexual transmitted infections. *J Med Virol* 2007; 79:1914-1920.
- Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV *et al.* Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49(4):225-230.
- Froment A, Delaporte E, Dazza M-C *et al.* HTLV-II among pygmies from Cameroon. *AIDS Res Hum Retrovirol* 1993; 8:707.
- Gessain A, De Thé G. What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13(1):S228-S235.
- Gotuzzo E, Arango C, Araujo AQC *et al.* Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North America* 2000; 14:211-239.
- Ishak R, Harrington Jr WR, Azevedo VN *et al.* Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kaiapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995; 11:813-825.
- Menna-Barreto M, Bender AL, Bonatto SL *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type II in Guaraní Indians, Southern Brazil. *Cad Saúde Púb (RJ)* 2005; 21(6):1947-1951.
- Levine PH, Jacobson S, Elliott R *et al.* HTLV-II infection in Florida Indians. *AIDS Res Hum Retrovirol* 1993; 9:123-127.
- Hjelle B, Cyrus S, Swenson S *et al.* Serologic distinction between human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and HTLV type II. *Transfusion* 1991; 31:731-736.
- Heneine W, Kaplan JE, Gracia F *et al.* HTLV-II endemicity among Guaymí Indians in Panama. *N Engl J Med* 1991; 324:565.
- Maloney EM, Biggar RJ, Neel JV *et al.* Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians *J Infect Dis* 1992; 166:100-107.
- Duenas-Barajas E, Bernal JE, Vaught DR *et al.* Human retroviruses in Amerindians of Colombia: high prevalence of human T cell lymphotropic virus type II infection among the Tunebo Indians. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49:657-663.
- Biglione M, Gessain A, Quiruelas S *et al.* Endemic HTLV-II infection among Tobas and Maticos Amerindians from North Argentina. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:631-633.
- Perez GE, Leon-Ponte M, Noya O *et al.* First description of endemic HTLV-II infection among Venezuelan Amerindians. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:1368-1372.
- Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi I *et al.* Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants to Brazil. *JAMA* 1986; 256:2342.



54. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABE, Proietti FA *et al.* Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pùb (RJ)* 2005; 21:926-931.
55. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML *et al.* HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34(5):527-531.
56. Costa EAS. Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2. [dissertação] São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2010, 101 pp.
57. Galvão-Castro B, Loures LGM, Rodrigues AS. Distribution of Human T-cell Lymphotropic Virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 1997; 37:242-243.
58. Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA *et al.* Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovirol* 2005; 21:256-262.
59. Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA *et al.* Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27(12):719-725.
60. Dal Fabbro MMFJ, Cunha RV, Boia MN *et al.* Infecção pelo HTLV 1/2: atuação no pré-natal como estratégia de controle da doença no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(2):148-151.
61. Ferreira Jr OC, Vaz RS, Carvalho MB *et al.* Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factor in blood donors from São Paulo, Brazil. *Transfusion* 1995; 35:258-263.
62. Segurado AAC, Malaque CMS, Sumita LM *et al.* Laboratory characterization of human T-cell lymphotropic virus types 1 (HTLV-1) and 2 (HTLV-2) infections in blood donors from São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:142-148.
63. Sabino EC, Zrein M, Taborda CP *et al.* Evaluation of the INNO-LIA HTLV-I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1324-1328.
64. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ *et al.* Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay testes in relation of *Western blot* in detecting human T-cell lymphotropic virus types I and II infection among HIV-1 infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30:173-182.
65. Olbrich Neto J, Meira DA. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu, São Paulo – Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37:28-32.
66. Etzel A, Shibata GY, Rozman M *et al.* HTLV-2 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26:185-190.
67. Dourado I, Andrade T, Carpenter CL *et al.* Risk factors for human T-cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in Northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:13-18.
68. Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in Northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26:490-494.
69. Pimenta FCF, Haddad SK, Medeiros Filho JG *et al.* Prevalence ratio of HTLV-1 in nursing mothers from the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *J Hum Lact* 2008; 24(3):289-292.
70. Carneiro-Proietti ABE, Ribas JGR, Catalan-Soares BC *et al.* Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:499-508.
71. Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN *et al.* The epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infections among indian populations of the Amazon region of Brazil. *Cad Saúde Pùb (RJ)* 2003; 19:109-118.
72. Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN *et al.* Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:371-376.
73. Lal RB, Heneine W. Testing of human T-cell lymphotropic virus types I and II: serologic, virologic and molecular detection. In: Höllsberg P, Hafler DA (eds.). *Human T-cell lymphotropic virus type I*. John Wiley & Sons Ltd., 1996.
74. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de dez. 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e da outras providências].
75. Brasil. Governo do Estado de Minas Gerais. Lei nº 17.344, de jan. 2008. Teste sorológico para HTLV é obrigatório na rede pública. [Abrange o diagnóstico, tratamento e prevenção dos vírus HTLV-1 e 2]. 2008.
76. Brasil. Ministério da Saúde. Guia do manejo clínico do HTLV. *Normas e Manuais Técnicos- Série Manuais*; nº 3-CN-DST e AIDS; Brasília (DF). 2003.
77. Kim JM, Song YG, Oho YC *et al.* Antibodies to human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) by particle agglutination (PA) test in Korean blood donors. *Yonsei Med J* 1999; 40(2):173-177.
78. CDC – Centers for Disease Control. Licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. *JAMA* 1989; 261:513, 518-520, 525.
79. Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods* 2009; 156 (1-2):150-151.
80. Wiktor SZ, Pate EJ, Weiss SH *et al.* Sensitivity of HTLV-I antibody assays for HTLV-II. *Lancet* 1991; 338:512-513.
81. Caterino-de-Araujo A. Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2). In: Curso de Procedimentos imunológicos e de Biologia Molecular aplicados ao estudo de Infecção por HTLV-I e II, 2008; p. 34-38.
82. Casseb J, Souza T, Pierre-Lima MT *et al.* Testing problems in diagnosing HTLV infection among intravenous drug users with AIDS in São Paulo city, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovirol* 1997b; 13:1639-1641.
83. Berini CA, Pascuccio MS, Bautista CT *et al.* Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods* 2008; 147:322-327.
84. Verdonck K, González E, Maldonado F *et al.* Comparison of three ELISAs for the routine diagnosis of human T-lymphotropic virus infection in a high-prevalence setting in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(4):420-422.
85. Kapprell HP, Stieler M, Oer M *et al.* Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II assay for blood screening and diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67(1):61-69.
86. Varma M, Rudolph DL, Knuchel M *et al.* Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by *Western blot* (immunoblot) assays containing recombinant glycoproteins. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3239-3244.
87. Poiesz BJ, Dube S, Choi D *et al.* Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. *Transfusion* 2000; 40:924-930.
88. Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 2009; 44:185-189.
89. Olah I, Fukumori LMI, Smid J *et al.* Neither molecular diversity of envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV *Western blot* profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. *J Med Virol* 2010; 82:837-842.
90. Césaire R, Bera O, Maier H *et al.* Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. *Transfusion* 1999; 39:1145-1149.
91. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS *et al.* Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49(6):361-364.
92. Lal RB, Brodine S, Kazura J *et al.* Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked *Western immunoblot* for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections. *J Clin Microbiol* 1992a; 30:296-299.
93. Rouet F, Meertens L, Courouble G *et al.* Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate *Western blot* patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4):1247-1253.
94. Maucière P, Le Hesran JY, Mahieux R *et al.* Demographic, ethnic and geographic differences between human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I-seropositive and persons with HTLV-1 gag-indeterminate *Western blots* in Central Africa. *J Infect Dis* 1997; 176:505-509.
95. Mahieux R, Horal P, Maucière P *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 1 gag indeterminate *Western blot* patterns in Central Africa: relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4049-4057.
96. Wytt JD, Kuramoto K, Kemper M *et al.* Utility of prospective study of donors deferred as HTLV indeterminate. *Vox sang.* 2000; 78:130-131.



97. Costa EAS, Magri MC, Caterino-de-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods* 2011; 173:280-286.
98. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS *et al.* Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 2008a; 42:149-155.
99. Gessain A, Mahieux R, De Thé G. HTLV-1 "indeterminate" *Western blot* patterns observed in sera from tropical regions: the situation revisited (letter). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 9:316-318.
100. Medrano FJ, Soriano V, Calderón EJ *et al.* Significance of indeterminate reactivity to human T-cell lymphotropic virus in *Western blot* analysis of individuals at risk. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:249-252.
101. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS *et al.* Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 2008; 42:149-155.
102. Waziri A, Soldan SS, Graf MD *et al.* Characterization and sequencing of prototypic human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) from an HTLV-1/2 seroindeterminate patient. *J Virol* 2000; 74:2178-2185.
103. Miyoshi I, Takemoto S, Tagushi H *et al.* Adult T-cell leukemia with cyclic neutropenia in a seronegative patient carrying only the tax gene of HTLV-I. *Ann J Hematol* 2002; 71(2):137-138.
104. Zrein M, Louwagie J, Boeykens H *et al.* Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(1):45-49.
105. Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MSS *et al.* Análise do uso da PCR em tempo real para HTLV-1 e 2 como teste confirmatório na triagem de doadores de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo* 2010; 43(2):111-115.
106. Estes MC, Sevall JS. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV I or II. *Mol Cell Probes* 2003; 17:59-68.
107. Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC *et al.* HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:548-552.
108. Sabino EC, Carvalho SMF. Diagnóstico laboratorial do HTLV. In: Proietti ABFC. HTLV – Cadernos Hemominas, 5ed., 2010; 15:60-67.
109. Ehrlich GD, Greenberg S, Abbott MA. Detection of a human T-cell lymphoma/leukemia viruses. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ *et al.* (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications, San Diego, California: Academic Press, 1990, p. 324-336.
110. Covas DT, Kashima S. Complete nucleotide sequences of the genomes of two brazilian specimens of human T lymphotropic virus type 2 (HTLV-2). *AIDS Res Hum Retrovirol* 2003; 19(8):689-697.
111. Lewis MJ, Novoa P, Ishak R *et al.* Isolation, cloning, and complete sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology* 2000; 271:142-154.
112. Magri MC, Morimoto HK, Brígido LFM *et al.* Long terminal repeat sequence analysis of HTLV-2 molecular variants identified in Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retrovirol* 2010; 26(12):1327-1331.
113. Switzer WM, Pieniazek D, Swanson P *et al.* Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol* 1995; 69:621-632.
114. Hjelle B, Zhu SW, Takahashi H *et al.* Endemic human T-cell leukemia virus type II infection in Southwestern U.S. Indians involves two prototype variants of virus. *J Infect Dis* 1993; 168:737-740.
115. Vrielink H, Zaaijer HL, Cuypers HTM *et al.* Evaluation of a new HTLV-I/II polymerase chain reaction. *Vox Sang* 1997; 72:144-147.
116. Costa JM, Sumita LM, Segurado AC. Non-radioisotope detection of pol sequences of HTLV-1 proviral DNA: Standardisation and sensitivity analysis. *J Virol Methods* 2006; 137(1):29-33.
117. Caterino-de-Araujo A. Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2). In: Curso de Procedimentos imunológicos e de Biologia Molecular aplicados ao estudo de Infecção por HTLV-I e II, 2008; p. 34-38.
118. Casseb J, Caterino-de-Araujo A, Hong M *et al.* Prevalence of HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 infected asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997a; 39:213-215.
119. Novoa P, Penalva de Oliveira AC, Posada Vergara MP *et al.* Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of São Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. *J Med Virol* 2007; 79:182-187.
120. Segurado ACC, Biasutti C, Zeigler R *et al.* Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:329-333.
121. Vallinoto ACR, Pontes GS, Muto NA *et al.* Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated afro-brazilian quilombo located in the Marajó island (Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:103-105.
122. Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2009; 68(2):182-186.
123. Costa EAS, Jacob F, Feliciano R *et al.* Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2009; 68(2):314-317.
124. Dall'agnol UAG. Coleção de soros para avaliação de kits de triagem sorológica (ensaios imunoenzimáticos – EIAs) de detecção de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 [monografia]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz 2010; 65pp.
125. Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. BEPA 2008b; 5:12-18.
126. Jacob F, Magri MC, Costa EAS *et al.* Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in "at-risk" individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods* 2009; 159(2):288-290.
127. Gudo ES, Abreu CM, Mussá T *et al.* Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo city, Mozambique. *Transfusion* 2009; 49(6):1146-1150.
128. Thorstensson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusion* 2002; 42:780-791.
129. Berini CA, Gendler AS, Pascuccio S *et al.* Decreasing trends in HTLV-1/2 but stable HIV-1 infection among replacement donors in Argentina. *J Med Virol* 2010; 82:873-877.
130. Kirstein LM, Mellors JW, Rinaldo CRJR *et al.* Effects of anticoagulant, processing delay, and assay method (branched DNA versus reverse transcriptase PCR) on measurement of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8):2428-2433.
131. Lee TH, Chafets DM, Busch MP *et al.* Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J Clin Virol* 2004; 31(4):275-282.
132. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res* 2005; 28:1643-1647.
133. Kamihira S, Dateki N, Sugahara K *et al.* Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. *Clin Lab Haematol* 2003; 25(2):111-117.
134. Montanheiro PA, Olah I, Fukumori LMI *et al.* Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res* 2008; 135:22-25.
135. Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation and quantification of human T-cell leukaemia viruses types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4):1129-1135.
136. Silva MTT, Harab RC, Leite AC *et al.* Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Proviral Load in Asymptomatic Carriers, HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis, and Other Neurological Abnormalities Associated with HTLV-1 Infection. *CID* 2007; 44:689-692.
137. Machuca A, Soriano V. *In vivo* fluctuation of HTLV-I and HTLV-II proviral load in patients receiving antiretroviral drugs. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 24(2):189-193.
138. Loureiro P. Infecção pelo HTLV-1: diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste. [tese]. Recife (PE): Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz 2008, 172 pp.
139. Primo J, Siqueira I, Nascimento MC *et al.* High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(8):761-764.
140. Sasaki D, Doi Y, Hasegawa H *et al.* High Human T Cell Leukemia Virus Type-1 (HTLV-1) Provirus Load in Patients with HTLV-1 Carriers Complicated with HTLV-1-unrelated disorders. *Virol J* 2010; 7(81).
141. Ono A, Mochizuki M, Yamaguchi K *et al.* Increased number of circulating HTLV-1 infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1 uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. *Br J Ophthalmol* 1995; 79(3):270-276.
142. Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Costa EAS *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1 infection in a patient with arthritis in Mozambique: molecular characterization of human T-lymphotropic virus type 1 isolate. *AIDS Res Hum Retrovirol* 2011; 27.



143. Beilke MA, Theall KP, O'Brien M *et al.* Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2):256-263.
144. Zehender G, Meroni L, Varchetta S *et al.* Human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) provirus in circulating cells of the monocyte/macrophage lineage in patients dually infected with HIV type 1 and HTLV-2 and having predominantly sensory polyneuropathy. *J Virol* 1998; 72:7664-7668.
145. Cimarelli A, Duclos CA, Gessain A *et al.* Quantification of HTLV-II proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, Central Africans, and Amerindians. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10:198-204.
146. Murphy EL, Lee TH, Chafets D *et al.* Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I *versus* HTLV-II, with HTLV-II subtype A *versus* B, and with male sex and a history of blood transfusion. *J Infect Dis* 2004; 190(3):504-510.
147. Toedter G, Pearlman S, Hofheinz D *et al.* Development of a monoclonal antibody-based p24 capsid antigen detection assay for HTLV-I, HTLV-II and STLV-I infection. *AIDS Res Hum Retrovirol* 1992; 8:527-532.
148. Kitamura K, Rudolph DL, Goldsmith C *et al.* Isolation, characterization and transmission of human T-lymphotropic virus types I and II in culture. *Curr Microbiol* 1993; 27:355-360.



## Capítulo 10

---

# Mononucleose Infecciosa

*Thelma Suely Okay*

- Introdução, 136
- Epidemiologia e transmissão, 136
- Características do vírus, 137
- Diagnóstico laboratorial, 138
- Referências bibliográficas, 140



## ► Introdução

O vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr virus*) é o agente causal da síndrome de mononucleose infecciosa (MI) caracterizada por febre, faringite e linfadenopatia. Além dessa apresentação clássica, a infecção primária pelo EBV pode manifestar-se de modo atípico em lactentes, idosos e pacientes imunodeficientes, e, assim, ser confundida com outras infecções. O EBV, também chamado de herpes-vírus humano 4 (HHV-4), é muito antigo e, provavelmente, evoluiu com seus diferentes hospedeiros ao longo dos últimos 9/10 milhões de anos.<sup>1</sup> Com habilidade de estabelecer latência e reativação intermitente ao longo da vida do hospedeiro após infecção primária, causando poucos sintomas na maioria dos indivíduos infectados, o EBV tornou-se ubiquitário. Há fortes indícios de que o vírus exerça papel fundamental na patogênese de várias doenças autoimunes, tais como dermatomiosite, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose múltipla e diabetes melito do tipo 1.<sup>2</sup> Outra característica do EBV é estar associado a várias doenças linfoproliferativas e neoplasias, particularmente o linfoma de Hodgkin, o linfoma de Burkitt, o carcinoma nasofaríngeo e linfomas do sistema nervoso em pacientes HIV-positivos.<sup>3,4</sup> Por esses motivos, a confirmação laboratorial da infecção causada pelo EBV é fundamental, e, apesar dos avanços na área da imunologia e do advento de técnicas moleculares, o desenvolvimento de testes rápidos e específicos para o diagnóstico dessa infecção ainda é um desafio para a medicina laboratorial.

O termo mononucleose infecciosa (MI) foi criado em 1920 para descrever uma síndrome caracterizada por febre, linfadenopatia, fadiga e linfocitose com predomínio de células mononucleares observada em seis pacientes.<sup>5</sup> No início da década de 1930, os trabalhos de Paul e Bunnell levaram à descoberta do teste para detecção de anticorpos heterófilos,<sup>6</sup> ainda utilizado atualmente no diagnóstico da MI. Paul e Bunnell observaram que soros obtidos de pacientes com MI aglutinavam eritrócitos de carneiro. Outros pesquisadores observaram que os soros desses pacientes também aglutinavam eritrócitos de outros animais (boi e cavalo) e que as proteínas responsáveis por essa aglutinação eram glicoproteínas encontradas na membrana de eritrócitos de vários mamíferos. Estudos subsequentes mostraram que proteínas extraídas de eritrócitos bovinos apresentavam avidéz ainda maior pelos anticorpos heterófilos do EBV.

O nome Epstein-Barr é oriundo dos nomes dos descobridores do vírus, Anthony M. Epstein e Yvonne Barr. Em 1961, Anthony Epstein, patologista especializado em microscopia, assistiu à palestra “Câncer infantil na África tropical – síndrome até agora não reconhecida”, proferida por Denis Burkitt Parsons, um cirurgião que trabalhava em Uganda e que descreveu o linfoma de Burkitt pela primeira vez. Em 1963, uma amostra de tumor infantil foi enviada de Uganda para o Hospital Middlesex, a fim de se cultivarem as células tumorais. Partículas do vírus foram, então, identificadas em culturas de células.<sup>7</sup> As linhagens celulares foram enviadas para Werner e Henle Gertrude, do Hospital Infantil da Filadélfia, e esses pesquisadores desenvolveram testes sorológicos.<sup>8,9</sup> Além disso, demonstraram que o vírus Epstein-Barr era o agente etiológico nos casos de MI associados a anticorpos heterófilos. Várias técnicas sorológicas que envolvem o uso de antígenos específicos do EBV têm surgido desde então. Em 1984, o genoma da cepa B95-8 do vírus foi totalmente sequenciado, o que facilitou, sobremaneira, o diagnóstico molecular de infecções causadas pelo EBV.<sup>10</sup>

## ► Epidemiologia e transmissão

Os sintomas da mononucleose infecciosa (febre glandular), que surgem após um período de incubação de 4 a 7 semanas, geralmente incluem linfadenopatia, febre e faringite.<sup>11</sup> O EBV é encontrado na orofaringe em aproximadamente 15% de adultos soropositivos e a excreção na saliva é mais frequente em pacientes com MI e em pacientes imunodeficientes (transplantados, portadores do HIV).<sup>12,13</sup> A transmissão ocorre por meio de contato íntimo, geralmente com secreções orais, de um indivíduo que está excretando o vírus. O EBV pode ser cultivado da orofaringe de pacientes com MI até 18 meses após a infecção.

A prevalência de anticorpos anti-EBV está diretamente relacionada com o nível socioeconômico da população estudada. Cerca de 50% da população apresenta anticorpos anti-EBV quando atinge 5 anos de idade, com uma taxa de soroconversão elevada durante a adolescência.<sup>14</sup> Em São Paulo, cerca de 80% da população já têm anticorpos anti-EBV aos 12 anos de idade.<sup>15,16</sup>

A infecção primária pelo EBV tem sido considerada assintomática ou incompleta quando ocorre em lactentes e crianças pequenas. Sendo assim, a maior parte do conhecimento sobre a infecção primária é derivada de estudos em adolescentes portadores de mononucleose infecciosa. No entanto, a premissa de que a infecção primária pelo EBV na infância seja sempre subclínica não é verdadeira.<sup>17</sup> Embora os sintomas possam ser mais amenos, a infecção primária em lactentes não é fundamentalmente diferente da MI da adolescência.<sup>18</sup>

A excreção do EBV na saliva de adultos pode variar de 22 a 90% durante um período de 12 meses.<sup>19,24</sup> Nesses e em outros estudos, não foi possível detectar qualquer associação entre a frequência de excreção viral ou o nível da carga viral na saliva e a presença do EBV em polimorfonucleares,<sup>20,24</sup> sugerindo que os fatores responsáveis pela reativação do EBV na orofaringe são diferentes daqueles que regem a variação da carga viral no sangue.

O EBV foi detectado em secreções do colo uterino com frequências que variaram de 8 a 28% em adolescentes e mulheres adultas, e também foi observado em amostras de sêmen,<sup>25-28</sup> entretanto, evidências sobre a transmissão do EBV por contato genital são limitadas. Estudo realizado em população masculina evidenciou que o EBV tipo 2 é significativamente mais prevalente em homens homossexuais do que entre heterossexuais masculinos, estando associado ao número de parceiros.<sup>29</sup> O modo exato de transmissão, no entanto, é desconhecido, uma vez que é difícil distinguir entre transmissão genital, contato orogenital ou pela saliva. A transmissão transplacentária e a transmissão por intermédio do leite materno têm sido relatadas em raras circunstâncias; por isso, são considerados modos de transmissão de pouca relevância médica.<sup>30-32</sup> O EBV pode ser transmitido por transfusão de sangue e por transplante de órgãos.<sup>33-34</sup> A transmissão do EBV é particularmente preocupante em pacientes que receberam transplantes de órgãos nos quais a infecção primária pelo EBV constitui um importante fator de risco para o desenvolvimento de doença linfoproliferativa (PTLD) pós-transplante.<sup>34-36</sup>

Como o contato íntimo parece ser responsável pela maioria dos casos de mononucleose infecciosa,<sup>37</sup> a incidência idade-específica da MI pode diferir em razão de diferenças de comportamento. Em crianças, o haplótipo ATA na região promotora da interleucina 10 está associado a níveis elevados de IL-10 e a idade mais tardia de aquisição da infecção primária



pelo EBV. Assim, o haplótipo ATA parece influenciar a idade na qual a infecção primária ocorre e, talvez, o risco de o indivíduo apresentar doença sintomática.<sup>38</sup> Estudos sobre os alelos do HLA deram origem a resultados conflitantes. Foi relatada maior frequência de HLA-B-3501 em casos de mononucleose infecciosa em relação aos indivíduos-controle; no entanto, estes dados não puderam ser reproduzidos.<sup>11</sup>

## ► Características do vírus

O EBV pertence à família Herpesviridae. À microscopia eletrônica, partículas virais apresentam nucleocapsídeo hexagonal envolvido por envelope de estrutura complexa, sendo indistinguíveis de outros herpes-vírus.

O isolamento do EBV somente é possível em linfócitos B e em células epiteliais da orofaringe de primatas, não havendo produção de efeito citopático. Linfócitos B infectados *in vitro* com EBV são capazes de proliferar continuamente, sendo denominados linfócitos imortalizados ou transformados; porém, apenas 10% dos linfócitos B expostos ao EBV em cultura se tornam imortalizados.<sup>4</sup> Após a transformação, as células progênicas passam a conter vírus sob forma latente, capazes de produzir vários antígenos passíveis de detecção por imunofluorescência indireta ou hibridização *in situ*. Os linfócitos B transformados *in vitro* têm ainda capacidade de produzir imunoglobulinas das classes IgG, IgA e IgM.<sup>39</sup>

Após replicação inicial em células da nasofaringe, nas quais sofrem replicação ativa,<sup>40</sup> a penetração do vírus em linfócitos B se faz por meio de uma ligação com o receptor C3d (CD21) do complemento, seguida de endocitose.<sup>41</sup> A partir dos linfócitos, os vírus infectam outros órgãos e sistemas, produzindo dois tipos de infecção:

- Lítica, na qual o DNA do EBV induz a produção de proteínas virais, ocorrendo lise de linfócitos e liberação de vírions
- Não lítica (latente), que é subdividida em quatro fases (I, II, III e IV ou latência zero), de acordo com o nível de expressão gênica do EBV e as proteínas expressas.

O ciclo lítico resulta da infecção aguda, e várias proteínas virais são expressas com o objetivo de produzir vírions infectantes. Formalmente, essa fase de infecção não leva inevitavelmente à lise da célula hospedeira contendo vírions do EBV.<sup>11</sup> O ciclo latente executa programas que não resultam na produção de vírions. Um conjunto muito limitado e distinto de proteínas virais é produzido durante o ciclo latente. Estas proteínas incluem os antígenos nucleares EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B e EBNA-3C, além da EBNA-proteína líder (EBNA-LP), de proteínas latentes da membrana LMP-1, LMP-2A e LMP-2B, e finalmente de RNA (EBER). Sequências que codificam ao menos 20 micro-RNA também são expressas em células com infecção latente.<sup>11</sup>

Na infecção latente, o genoma do EBV é incorporado ao genoma dos linfócitos do paciente permanentemente. Após 24 h da entrada do EBV no linfócito, podem-se detectar antígenos nucleares (EBNA), os quais são os responsáveis pela imortalização do linfócito. Linfócitos B imortalizados têm a capacidade de produzir várias imunoglobulinas policlonais. Anticorpos que reagem com eritrócitos de carneiro (heterófilos) e outros constituem o resultado da produção de imunoglobulinas policlonais pelos linfócitos B imortalizados. Poucos linfócitos B infectados pelo EBV são lisados, provocando a liberação de antígenos específicos do vírus, os quais funcio-

nam como marcadores da replicação viral ativa. Esses antígenos podem ser divididos em antígenos de expressão precoce (EA) e antígenos da cápside viral (VCA). Os antígenos precoces subdividem-se em antígenos difusos (EA-D), detectáveis no citoplasma e no núcleo das células infectadas, e antígenos restritos (EA-R), encontrados somente no citoplasma.<sup>42</sup>

As proteínas virais EBNA-2, EBNA-3C e LMP-1 são essenciais para a transformação celular e estão associadas ao desenvolvimento de tumores, enquanto a EBNA-LP e os EBER não estão. A proteína EBNA-1 é essencial para a manutenção do genoma do vírus.<sup>11</sup> Postula-se que, após a infecção natural com EBV, o vírus execute alguns ou todos os programas de seu repertório de expressão gênica para estabelecer uma infecção persistente. O Quadro 10.1 apresenta um resumo das proteínas, dos genes e dos antígenos expressos pelo EBV durante as fases latente e lítica da infecção.

Em razão da ausência inicial de imunidade no hospedeiro, o ciclo lítico produz grandes quantidades de vírions para infectar outros linfócitos B no interior do mesmo hospedeiro. Os programas de latência, por outro lado, são capazes de reprogramar linfócitos B infectados. Eventualmente, quando o hospedeiro desenvolve imunidade, o vírus consegue sobre-

**Quadro 10.1 • Proteínas, genes e antígenos do vírus Epstein-Barr (EBV).**

Proteína/ gene/antígeno	Estágio	Descrição
EBNA-1	Latente + lítico	EBNA-1 é uma proteína que se liga ao local de origem da replicação do vírus (oriP) no genoma viral e medeia a replicação durante a divisão celular da célula do hospedeiro. É a única proteína viral expressa durante a fase I de latência
EBNA-2	Latente + lítico	EBNA-2 é o principal transativador viral
EBNA-3	Latente + lítico	Esses genes se ligam à proteína RBP-Jk do hospedeiro
LMP-1	Latente	LMP-1 é uma proteína transmembrana essencial para o crescimento e a transformação de células, infectadas pelo EBV
LMP-2	Latente	LMP-2A/IMP-2B são proteínas transmembrana que atuam bloqueando a sinalização via tirosinoquinases
EBER	Latente	EBER-1/EBER-2 são pequenos RNA nucleares que se ligam a determinadas proteínas nucleares, possibilitando a ligação ao PKR (RNA de dupla fita dependentes de serinas e treoninoquinases), inibindo sua função. EBER também induzem a produção de IL-10, que, por sua vez, aumenta o crescimento celular e inibe a toxicidade de células T
miRNA	Latente	Os micro-RNA do EBV são codificados por dois transcritos, um deles localizado no gene BART e o outro próximo ao <i>cluster</i> do gene BHRF1. Os três micro-RNA do BHRF1 são expressos durante a fase III de latência enquanto o grande <i>cluster</i> dos micro-RNA do gene BART é expresso durante a fase II de latência. A função desses micro-RNA é ainda desconhecida
EBV-EA	Lítica	Antígeno precoce ou <i>early antigen</i>
EBV-MA	Lítica	Antígeno de membrana
EBV-VCA	Lítica	Antígeno da cápside viral
EBV-na	Lítica	Nuclease alcalina



viver, “desligando” a maioria (ou quase todos) os seus genes, porém, reativando a produção de novos vírions de tempos em tempos. O equilíbrio entre a reativação viral ocasional e a vigilância imune do hospedeiro é alcançado com a remoção das células que ativam a expressão viral da circulação. A região de persistência do EBV parece ser a medula óssea, uma vez que pacientes EBV-positivos que tiveram sua medula óssea substituída pela medula óssea de doadores EBV-negativos se tornaram EBV-negativos após o transplante.<sup>35</sup>

Dois tipos de EBV, chamados de 1 e 2 (ou A e B), são reconhecidos com base em diferenças nos antígenos nucleares e na habilidade de infectar linfócitos B *in vitro*. O EBV tipo 1 transforma rapidamente linfócitos B *in vitro*, enquanto o tipo 2 infecta os linfócitos com menor eficiência. Sabe-se que os subtipos do EBV (1 e 2) parecem ter distribuição geográfica distinta, e que a maioria dos indivíduos não imunodeficientes está infectada com subtipos específicos. O tipo 1 é o mais prevalente e o mais frequentemente isolado da orofaringe de indivíduos assintomáticos. O tipo 2 é o mais prevalente em indivíduos previamente infectados com o tipo 1 e portadores de HIV. Pacientes imunodeficientes apresentam uma população heterogênea e mutável de subtipos 1 e 2 do EBV.<sup>43</sup>

## ► Diagnóstico laboratorial

### ■ Diagnóstico hematológico

As alterações hematológicas mais frequentes são:

- *Linfocitose absoluta* (> 4.500) e *relativa* (> 50% do número de leucócitos): ocorre em cerca de 70% dos casos. A linfocitose atinge os níveis mais elevados durante a segunda ou a terceira semana de doença, e, ocasionalmente, pode sugerir um quadro de reação leucemoide. Linfócitos atípicos são muito variáveis e, embora sugestivos, não são patognômicos de infecção pelo EBV. Outras afecções associadas à linfocitose atípica incluem: citomegalovirose, infecção pelo herpes-vírus-6, HIV, hepatites virais, rubéola, caxumba, toxoplasmose, linfomas, leucemias linfóides e reações adversas a fármacos<sup>44</sup>
- *Neutropenia*: ocorre em 60 a 90% dos pacientes e costuma ser autolimitada<sup>45</sup>
- *Trombocitopenia*: 50% dos pacientes apresentam plaquetas < 140.000/mm<sup>3</sup>.<sup>46</sup>

Outras alterações comuns são: elevação dos níveis de imunoglobulinas das classes IgM, IgG e IgA e aumento das concentrações de enzimas hepáticas.<sup>47</sup>

### ■ Diagnóstico sorológico

#### Anticorpos heterófilos

O teste de Paul-Bunnell-Davidsohn ainda é bastante empregado em nosso meio, sobretudo para testar pacientes imunocompetentes. Este teste está fundamentado nos mesmos princípios anteriormente descritos que dependem da presença de anticorpos heterófilos, exceto por ser realizado em tubos de ensaio. Os testes de aglutinação rápida disponíveis comercialmente apresentam sensibilidade semelhante ou ligeiramente superior ao teste de Paul-Bunnell tradicional, com a vantagem de serem executados mais rapidamente.

Em pacientes com suspeita de infecção primária pelo EBV, o Monospot® ou similares, tais como Monoslide® e

Monolatest®, são indicados como teste inicial. Se o teste for positivo, a realização de outros testes para a identificação de anticorpos específicos não é necessária em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, se o Monospot® for negativo, os casos suspeitos deverão ser avaliados por meio da determinação de anticorpos específicos para o EBV. É importante lembrar que o Monospot® é pouco útil no diagnóstico de MI em pacientes imunodeficientes, uma vez que a maior parte deles não produz anticorpos heterófilos.

#### Anticorpos específicos

Estes testes são úteis no diagnóstico de MI com anticorpos heterófilo-negativos (10% dos casos) e em casos atípicos. Linfócitos B infectados com o EBV produzem vários anticorpos específicos, os quais podem ser detectados por imunofluorescência ou testes imunoenzimáticos. É importante enfatizar que anticorpos específicos não devem ser valorizados no diagnóstico de MI crônica se forem encontrados em títulos baixos ou moderados (VCA < 1:320 e EA < 1:40), uma vez que esses títulos podem ser encontrados após vários anos em indivíduos que tiveram infecção não complicada.<sup>48</sup>

#### Cultura do vírus

Muito embora o EBV possa ser cultivado a partir de secreções orofaríngeas ou de linfócitos em cerca de 90% dos pacientes com MI aguda, as dificuldades técnicas associadas ao cultivo viral e o fato de o EBV poder ser cultivado a partir da orofaringe de indivíduos saudáveis faz com que esse teste apresente pouco valor clínico.<sup>49</sup>

#### Técnicas moleculares

Atualmente, inúmeros kits comerciais de hibridização ou de hibridização *in situ* estão disponíveis. As técnicas de hibridização tornam possível distinguir entre infecção ativa ou latente, e ainda se o EBV é de origem monoclonal ou policlonal, porém apresentam menor sensibilidade quando comparadas às técnicas de amplificação qualitativas ou quantitativas, as quais também se encontram disponíveis comercialmente e apresentam a vantagem de poderem ser aplicadas ao monitoramento de pacientes em tratamento, o que é extremamente útil em indivíduos transplantados com doença linfoproliferativa. Na versão RT-qPCR, isto é, analisando a expressão de genes que são amplificados após reação de transcrição reversa com metodologia quantitativa, é possível distinguir as diferentes fases de latência e os períodos de reativação da infecção crônica.<sup>50,51</sup>

Durante estudo realizado por Okay *et al.*,<sup>52</sup> 24 amostras de sangue total e de soro foram obtidas de uma criança de 8 anos de idade, que recebeu um transplante cardíaco e foi acompanhada por 36 meses. Aos 5 anos de idade, a criança apresentou sinais e sintomas compatíveis com MI, e a sorologia para o EBV foi positiva para o VCA-IgM e IgG e negativa para EBNA-IgG. Após 14 meses, os parâmetros sorológicos mostravam VCA-IgG positivo, EBNA-IgG e VCA-IgM negativos; esse padrão sorológico persistiu mesmo durante episódios sugestivos de reativação. A PCR amplificou um fragmento oriundo da glicoproteína gp220 do EBV e o limiar de detecção foi de 100 cópias virais. Todas as 24 amostras de sangue total apresentaram resultados positivos por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), enquanto 12 das 24 amostras de soro foram positivas. Com o intuito de analisar se a detecção de EBV-DNA em amostras de soro poderia ser utilizada como marcador dos episódios de reativação da infecção, consideramos os períodos nos quais a



criança necessitou de internação e administração de antiviral como indicativos dos períodos de reativação. A análise estatística mostrou que houve associação entre os dois parâmetros (PCR positiva em soro *versus* internação e tratamento). Essa correlação foi analisada pelo teste de concordância kappa (valor de  $r = 0,75$  com  $p < 0,001$ ). Concluiu-se que a detecção de EBV-DNA em amostras de soro de pacientes imunossuprimidos poderia ser utilizada como marcador laboratorial de reativação da infecção na falta de técnicas quantitativas, tais como a *real-time PCR* (PCR em tempo real).

O achado de DNA viral em soro de indivíduos saudáveis é excepcional, mas na fase aguda da MI altas cargas virais do EBV são encontradas no soro da maior parte dos pacientes. O pico de carga viral sérica é observado nos primeiros 7 dias de doença, posteriormente a carga viral é reduzida com a resolução de sintomas, mas parece haver consideráveis diferenças entre indivíduos.<sup>53</sup> Paralelamente ao aumento da carga viral no soro, a carga viral do EBV em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) aumenta durante as primeiras semanas de doença, e, posteriormente, declina.<sup>54</sup> Elevadas cargas virais, entretanto, são encontradas na saliva por um período mínimo de 6 meses após o início dos sinais clínicos, estando associadas à persistência da infectividade.<sup>55</sup>

Os testes moleculares também têm sido empregados no diagnóstico laboratorial da infecção crônica ativa pelo EBV (CAEBV), descrita pela primeira vez no final dos anos 1970 e caracterizada pela presença de infecção crônica e recorrente causada pelo EBV com sintomas semelhantes aos da síndrome da mononucleose infecciosa, porém com um padrão incomum de anticorpos anti-EBV. O quadro clínico é caracterizado por linfadenopatia, esplenomegalia, pancitopenia, hepatite, má absorção intestinal, pneumonite e uveíte.<sup>42</sup> O padrão sorológico característico inclui altos títulos de VCA-IgG  $> 1:5.120$ , altos títulos do antígeno precoce (EA  $> 1:640$ ) e baixos títulos de EBNA ( $< 1:2$ ). Os critérios para o diagnóstico da CAEBV foram sugeridos, e recentemente um novo conjunto de diretrizes foi proposto.<sup>56,57</sup> Além do padrão de anticorpos que se assemelha ao da infecção aguda e é caracterizado por altos títulos de anticorpos IgG anti-VCA e EA (*early antigens*), com ausência de anticorpos anti-EBNA (antígenos nucleares), pacientes com CAEBV também apresentam menor número de linfócitos CD8+ EBV-específicos em relação a pacientes com MI ou a indivíduos assintomáticos que se recuperaram de MI.<sup>58</sup> No entanto, pacientes com CAEBV apresentam cargas virais elevadas em linfócitos de sangue periférico e em soro.<sup>59</sup>

Não há até o momento nenhum indício de que o estabelecimento da CAEBV esteja associado a mutações gênicas, incluindo o gene responsável pela síndrome linfoproliferativa ligada ao X.<sup>60</sup> A CAEBV parece constituir um espectro de doenças que cursam com a ativação incomum do EBV, causando infecções crônicas sintomáticas com presença de anticorpos anti-EBV moderadamente elevados. Entretanto, podem ocorrer situações mais graves de infecção crônica ativa com anticorpos anti-EBV extremamente elevados, expansão clonal de células T e células NK infectadas pelo EBV, com agravamento do quadro clínico, levando à pancitopenia e à insuficiência hepática, culminando com elevada mortalidade.<sup>59,61</sup>

Apesar de o EBV ter sido detectado em todas as populações e áreas do mundo,<sup>18</sup> foram observadas variações geográficas notáveis na distribuição dos dois principais genótipos, que diferem em relação aos genes que codificam algumas das proteínas nucleares em células cronicamente infectadas.<sup>62</sup> Ambos os tipos são detectados em todo o mundo, sendo o

tipo 1 o mais prevalente. Em algumas regiões (África Central, Papua-Nova Guiné e Alasca), entretanto, o tipo 2 é mais prevalente.<sup>63,64</sup> Supõe-se que a distribuição geográfica dos dois tipos de EBV reflita a prevalência geral nas áreas envolvidas.<sup>63</sup> Assim, parece haver uma clara associação entre os dois genótipos virais e doenças específicas.

Na maioria das áreas, o encontro do tipo 2 é incomum, exceto em pacientes imunodeficientes, HIV-positivos e transplantados. O aumento da detecção em indivíduos imunodeficientes tem sido explicado por um aumento da exposição ao vírus exógeno combinado com imunidade celular EBV-específica deficiente.<sup>63</sup> A frequência do genótipo 2 do EBV em hemofílicos HIV-positivos é comparável à frequência em indivíduos saudáveis, o que indica que a imunodeficiência, por si, não é responsável pelo aumento da detecção do tipo 2.<sup>65</sup>

Recentemente, em estudo realizado por Mendes *et al.*,<sup>66</sup> 44 crianças e adolescentes (21 pacientes transplantados de fígado, 7 submetidos a transplante cardíaco, 5 com AIDS, 3 com hepatite autoimune, 2 com síndrome nefrítica, 2 com aplasia medular, 2 com imunodeficiências primárias, 1 com púrpura trombocitopênica e 1 com lúpus eritematoso sistêmico), todos eles apresentando infecção crônica ativa pelo EBV (CAEBV) com VCA-IgM persistentemente positivo, VCA-IgG  $> 1:5.120$  e EBNA-IgG positivo, tiveram amostras de sangue periférico obtidas durante os episódios de reativação caracterizados clinicamente. Amostras de DNA foram amplificadas com o objetivo de realizar a detecção e a tipagem de EBV (tipo 1 ou 2) utilizando como alvo a sequência que codifica o EBNA-2, sabendo que este antígeno nuclear do EBV é essencial para a imortalização de linfócitos B. Embora tenha-se encontrado um predomínio do EBV tipo 1 do EBNA-2 (33/44, 75%), 10 pacientes (22,73%) tinham o tipo 2, e um paciente transplantado de fígado (2,27%) apresentava os dois tipos de EBV. Na população estudada formada por crianças e adolescentes com imunodeficiências primárias e secundárias, além de doenças autoimunes, foi encontrada maior proporção do tipo 2 do EBV do que seria esperado para uma população pediátrica. No entanto, em populações de maior risco para o desenvolvimento de doença linfoproliferativa (PTLD) associada ao EBV, notadamente linfomas, também existe aumento da detecção do tipo 2 em relação ao tipo 1, e da coinfeção pelos dois tipos. Esses estudos amplificaram amostras de tumores para a detecção do EBV e a tipagem, enquanto no estudo de Mendes *et al.*<sup>66</sup> foi testado sangue periférico de crianças que ainda não haviam desenvolvido tumores, porém faziam parte do grupo de risco. Concluiu-se que a tipagem do EBNA-2 pode ser realizada em amostras de sangue periférico, e a alta prevalência do tipo 2 na casuística indica que essa população apresenta de fato maior risco de desenvolver PTLD, e que, por isso, deveria ser monitorada.

A distribuição de polimorfismos em sequências específicas do DNA do EBV também mostra variação geográfica, sendo a epidemiologia do oncogene codificado pelo gene LMP-1 do EBV a mais estudada. Inúmeras variações na sequência do LMP-1 foram detectadas e algumas delas têm sido associadas a um risco aumentado de carcinoma da nasofaringe.<sup>67</sup> Estudos indicam que sequências variantes do LMP-1 estão associadas ao carcinoma de nasofaringe em áreas de alta prevalência da doença, tais como o Sudeste Asiático,<sup>68</sup> sugerindo que a pressão seletiva positiva sobre o LMP-1 possa aumentar o potencial oncogênico do vírus.

Diferenças na prevalência e nos padrões de infecção nunca foram claramente associadas à origem étnica, mas foram apenas observadas como diferenças no comportamento socio-



econômico, higiênico e cultural. No entanto, a distribuição diferenciada do carcinoma de nasofaringe com alta incidência observada em esquimós do Ártico e no Sudeste Asiático sugere a existência de um controle imunológico específico do EBV nessas etnias, embora o mecanismo exato permaneça desconhecido.<sup>69,70</sup>

Durante a última década, os métodos para detecção e quantificação do EBV intra e extracelular a partir de sangue periférico têm melhorado significativamente. A carga viral de EBV em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) é o resultado combinado do número de células B infectadas e o número de genomas de EBV por célula B. Um número relativamente constante de células B infectadas (1 a 50 por 1.000.000) está presente no sangue periférico de um hospedeiro saudável cronicamente infectado, mas este valor parece variar consideravelmente em indivíduos de uma mesma população.<sup>71</sup> Diferenças nos métodos de detecção, preparação de amostras e unidades de medida tornam as comparações de cargas virais de EBV em diferentes estudos impraticáveis. Entretanto, a carga viral do EBV parece estar transitoriamente elevada na infecção primária.<sup>72</sup> Em geral, a carga viral, observada em PBMC de indivíduos saudáveis, é baixa (< 100 cópias de DNA viral/μg de DNA genômico humano) em comparação a cargas elevadas observadas em pacientes transplantados com doença linfoproliferativa.<sup>73,74</sup> A baixa carga viral do EBV na maioria dos indivíduos assintomáticos, porém cronicamente infectados pelo EBV, reflete a baixa frequência de células B EBV-positivas em circulação, enquanto as cargas virais elevadas na PTLT em pacientes imunossuprimidos são o resultado do aumento do número de células B contendo EBV em circulação,<sup>75,76</sup> juntamente com o aumento do número de genomas do EBV em cada célula B infectada.<sup>77</sup>

A associação entre a carga viral do EBV em PBMC e a resposta sorológica não é de fácil compreensão.<sup>78</sup> Altos títulos de anti-p18-VCA são sugestivos de replicação viral lítica e normalmente estão associados a elevadas cargas virais, assim como baixos títulos de anti-EBNA-1 IgG também têm sido associados a altas cargas virais em portadores do HIV.<sup>73,74</sup> O EBV em soro ou plasma é frequentemente detectado em pacientes com carcinoma de nasofaringe ou PTLT, porém apenas muito raramente em indivíduos saudáveis.<sup>79</sup>

## ■ Resumo da confirmação do diagnóstico laboratorial

A confirmação do diagnóstico laboratorial em pacientes imunocompetentes tem sido tradicionalmente baseada na detecção de atipias linfocitárias e presença de anticorpos heterófilos, encontrados em mais de 80% de adolescentes e adultos com MI,<sup>80</sup> mas em frequência muito mais baixa em crianças pequenas com infecção aguda.<sup>17</sup> Entretanto, devemos lembrar que a detecção de anticorpos heterófilos pode ocorrer em outras condições, incluindo a infecção pelo HIV, o lúpus eritematoso sistêmico e outras infecções virais.<sup>81-83</sup> A detecção de anticorpos IgM dirigidos contra o antígeno da cápside viral (VCA) é mais sensível e específica, e é encontrada no início dos sintomas. No entanto, assim como os anticorpos heterófilos, o anti-VCA IgM é transitório e desaparece em alguns meses. A detecção de DNA do EBV em soro ou plasma por meio de técnica qualitativa ou quantitativa pode ser útil para o diagnóstico laboratorial, como exame complementar à sorologia, e também para o acompanhamento de pacientes em tratamento. O monitoramento da carga viral do EBV em PBMC

ou em plasma/soro por meio de técnicas moleculares é eficaz na detecção de episódios de reativação por ser mais sensível que os métodos sorológicos tradicionais. Esta é a justificativa para que a detecção quantitativa do EBV em sangue, soro ou plasma esteja se tornando o teste de referência e já constitua o exame laboratorial mais solicitado em pacientes imunodeficientes com doença crônica ativa causada pelo EBV.<sup>84</sup>

## ► Referências bibliográficas

- McGeoch DJ, Cook S, Dolan A *et al.* Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpes viruses. *J Mol Biol* 1995; 247(3):443-458.
- Kieff E. Epstein-Barr virus: New insights. *J Infect Dis* 1995; 171:1323-1324.
- Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59:94.
- Henderson E, Miller G, Robinson J *et al.* Efficiency of transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Virology* 1977; 76:152-163.
- Sprunt, TP, Evans, FA. Mononuclear leukocytosis in reaction to acute infections ("infectious mononucleosis"). *Johns Hopkins Hosp Bull* 1920; 31:410.
- Paul JR, Bunnell W. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am J Med Sci* 1932; 183:90-104.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Viruses particles in cultured lymphocytes from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 15:702-703.
- Henle G, Henle W. Immunofluorescence, interference and complement fixation techniques in the detection of herpes-type virus in Burkitt tumor cell lines. *Cancer Res* 1967; 27(12):2442-2446.
- Henle G, Henle W, Clifford P *et al.* Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43(5):1147-1157.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD *et al.* DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984; 310:207-211.
- Chang RS. Infectious mononucleosis. Boston: GK Hall Medical Publishers, 1980.
- Niederman JC, Miller G, Pearson HA *et al.* Infectious mononucleosis: Epstein Barr virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* 1976; 294:1355-1359.
- Ferbas J, Rahman MA, Kingsley LA *et al.* Frequent oropharyngeal shedding of Epstein-Barr virus in homosexual men during early HIV infection. *AIDS* 1992; 6:273-278.
- Pereira MS, Blake JM, Macrae AD. EB virus antibody at different ages. *Br Med J* 1969; 4:526.
- Candeias JAN, Pereira MS. A survey for EB virus antibody in adults and children of different ages. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1970; 12:333-338.
- Carvalho RPS *et al.* EBV infections in Brazil. I. Occurrence in normal persons, in lymphomas and in leukemias. *Int. J Cancer* 1975; 11:191-201.
- Chan CW, Chiang AK, Chan KH *et al.* Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis in Chinese children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(11):974-978.
- IARC Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1997; 70:1-492.
- Apolloni A, Sculley TB. Detection of A-type and B-type Epstein-Barr virus in throat washings and lymphocytes. *Virology* 1994; 202(2):978-981.
- Haque T, Crawford DH. PCR amplification is more sensitive than tissue culture methods for Epstein-Barr virus detection in clinical material. *J Gene Virol* 1997; 78(12):3357-3360.
- Ikuta K, Satoh Y, Hoshikawa AY *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect* 2000; 2(2):115-120.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N *et al.* Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984; 310(19):1225-1230.
- Yao QY, Rowe M, Martin B *et al.* The Epstein-Barr virus carrier state: dominance of single growth-transforming isolate in the blood and in the oropharynx of healthy virus carriers. *J Gene Virol* 1991; 72(7):1579-1590.
- Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA *et al.* The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: A 14-month longitudinal study. *J Infect Dis* 2003; 187(10):1571-1580.
- Enborn M, Strand A, Falk KI *et al.* Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8 DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis* 2001; 28(5):300-306.
- Israeli V, Shirley P, Sixbey JW. Excretion of the Epstein-Bar virus from the genital tract of men. *J Infect Dis* 1991; 163(6):1341-1343.



27. Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C *et al.* Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2003; 9(suppl):31566-31570.
28. Naher H, Gissman L, Freese UK *et al.* Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female genital tract-indication for sexual transmission. *J Invest Dermatol* 1992; 98(5):791-793.
29. Van Baarle D, Hovenkamp E, Dukers NH *et al.* High prevalence of Epstein-Barr type 2 among sexual men is caused by sexual transmission. *J Infect Dis* 2000; 181(6): 2045-2049.
30. Fleisher G, Bologonese R. Infectious mononucleosis during gestation: report of three women and their infants studied perospectively. *Pediatr Infect Dis*, 1984; 3(4):308-311.
31. Kusuha K, Takabayashi A, Ueda K *et al.* Breast milk is not-significant source for early Epstein-Barr virus or human herpes virus 6 infection in infants: A seroepidemiologic study in 2 endemic areas of human T-cell lymphotropic virus type I in Japan. *Microbiol Immunol* 1997; 41(4):309-312.
32. Meyohas MC, Marechal V, Desire N *et al.* Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J Virol* 1996; 70(10): 6816-6819.
33. Alfieri C, Tanner J, Carpentier L *et al.* Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 1996; 87(2):812-817.
34. Cheenstra R, Verschuuren EA, de Haan A *et al.* The value of prospective monitoring of Epstein-Barr virus DNA in blood samples of pediatric liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2004; 611-612.
35. Aguilar LK, Rooney CM, Heslop HE. Lymphoproliferative disorders involving Epstein-Barr virus after hemopoietic steam cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 1999; 11(2):96-101.
36. Bodeus M, Smets F, Reding R *et al.* Epstein-Barr virus infection in sixty pediatric liver graft recipients: diagnosis of primary infection and virologic follow-up. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(8):698-702.
37. Crawford DH, Swedlow AJ, Higgins C *et al.* Sexual history and Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 2002; 186(6):731-736.
38. Helminen ME, Kilpinen S, Virta M *et al.* Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with IL-10 gene promoter polymorphism. *J Infect Dis* 2001; 184(6):777-780.
39. Brown NA, Miller G. Immunoglobulin expression by human B lymphocytes clonally transformed by Epstein-Barr virus. *J Immunol* 1982; 28:24-9.
40. Young LS, Sixbey JB, Clark D *et al.* Epstein-Barr virus receptor on human pharyngeal epithelia. *Lancet* 1986; 1:240-242.
41. Frade R, Barel M, Ehlin-Eriksson B *et al.* Gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1490-1493.
42. Jones JF, Strauss SE. Chronic Epstein-Barr virus infection. *Ann Rev Med* 1987; 38:195.
43. Van Baarle D, Hovenkamp E, Kersten MJ *et al.* Direct Epstein-Barr virus (EBV) typing on peripheral blood mononuclear cells: no association between EBV type 2 infection or superinfection and the development of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999; 93(11):3949-3955.
44. Wood TA, Frenkel EP. The atypical lymphocyte. *Am J Med* 1967; 42:923.
45. Carter RL. Granulocyte changes in infectious mononucleosis. *J Clin Pathol* 1966; 19:279-283.
46. Carter RL. Platelet levels in infectious mononucleosis. *Blood* 1965; 25:817-821.
47. Rosalki SB, Jones TG, Verney AF. Transaminase and liver function studies in infectious mononucleosis. *Br Med J* 1960; 1:929-932.
48. Horwitz CA, Henle W, Henle G *et al.* Long-term serological follow-up of patients for Epstein-Barr virus after recovery from infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1985; 151:1150.
49. Chang RS, Golden HD. Transformation of human leukocytes from throat washings from infectious mononucleosis patients. *Nature* 1971; 234:359-360.
50. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T. Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1765-1768.
51. Gan Y, Sullivan JL, Sixbey JW. Detection of cell-free Epstein-Barr virus DNA in serum during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1994; 170:436-439.
52. Okay TS, Del Negro GM, Yamamoto L *et al.* Detection of EBV-DNA in serum samples of an immunosuppressed child during three years follow-up: association of clinical and PCR data with active infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2005; 47(2):99-102.
53. Berger C, Day P, Meier G *et al.* Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. *J Med Virol* 2001; 64(4):505-512.
54. Kimura H, Morita M, Yabuta Y *et al.* Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37:132-136.
55. Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP *et al.* Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005; 191 (6): 985-989.
56. Straus SE. The chronic mononucleosis syndrome. *J Infect Dis* 1988; 157 (3): 405-412.
57. Okano M, Kawa K, Kimura H *et al.* Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol* 2005; 80 (1): 64-69.
58. Sugaya N, Kimura H, Hara S *et al.* Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV-specific CD8 +T cells in patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 2004; 190 (5): 985-988.
59. Kimura H, Hoshino Y, Kanegane H *et al.* Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood* 2001; 98 (2): 280-286.
60. Sumazaki R, Kanegane H, Osaki M *et al.* SH2D1A mutations in Japanese males with severe Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Blood* 2001; 98 (4): 1268-1270.
61. Okano M. Overview and problematic standpoints of severe chronic active Epstein-Barr virus infection syndrome. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44 (3): 273-282.
62. Sample J, Young L, Martin B *et al.* Epstein-barr virus type 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B and EBNA-3C genes. *J Virol* 1990; 64 (9): 4084-4092.
63. Gratama JW & Ernber GI. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv Cancer Res* 1995; 67:197-255.
64. Zimmer U, Adldinger HK, Lenoir GM *et al.* Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 1986; 154 (1): 56-66.
65. Yao QY, Croom-Carter DS, Tierney RJ *et al.* Epidemiology of infection with Epstein-barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. *J Virol* 1998; 72 (5): 4352-4363.
66. Mendes TM, Oliveira LC, Yamamoto L *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 detection and typing in immunocompromised children correlated with lymphoproliferative disorder biopsy findings. *Braz J Infect Dis* 2008; 12 (3):186-191.
67. Jeng KC, Hsu CY, Liu MT *et al.* Prevalence of Taiwan variant of Epstein-Barr virus in throat washings from patients with head and neck tumors in Taiwan. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (1): 28-31.
68. Burrows JM, Bromham L, Woo LM *et al.* Selection pressure-driven evolution of Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J Virol* 2004; 78 (13): 7131-7137.
69. Hildeshein A, Apple RJ, Chen CJ *et al.* Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (23): 1780-1789.
70. Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2002; 12 (6): 421-429.
71. Khan G, Miyashita EM, Yang B *et al.* Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 1996; 5 (2): 173-179.
72. Fan H, Guley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV-related disease. *Mol Diagn* 2001; 6 (4): 279-289.
73. Stevens SJ, Blank BS, Smits PH *et al.* High Epstein-Barr virus (EBV) DNA loads in HIV-infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. *AIDS* 2002a; 16 (7): 993-1001.
74. Stevens SJ, Verschuuren EA, Verkuujlen SA *et al.* Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* 2002b; 43 (4): 831-840.
75. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB *et al.* Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190 (4): 567-676.
76. Yang J, Tao Q, Flinn IW *et al.* Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with postransplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood* 2000; 96 (13): 4055-4063.
77. Rose C, Green M, Webber S *et al.* Detection of Epstein-Barr virus genome in peripheral blood B cells from solid-organ transplant recipients by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (7): 2533-2544.
78. Gartner BC, Kortmann K, Schafer M *et al.* No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (6): 2458.
79. Lechowicz MJ, Lin L, Ambinder RF. Epstein-Barr virus DNA in body fluids. *Curr Opin Oncol* 2002; 14 (5): 533-537.
80. Fleisher GR, Collins M, Fager S. Limitations of available tests for diagnosis of infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1983; 17 (4): 619-624.
81. Hendry BM & Longmore JM. Systemic lupus erithematosus presenting as infectious mononucleosis with-false positive monospot test. *Lancet* 1982; 20, 1 (8269): 455.
82. Horwitz CA, Henle W, Henle G *et al.* Persistent falsely positive rapid tests for infectious mononucleosis. Report of five cases with four-six-year follow-up data. *Am J Clin Pathol* 1979; 72 (5): 807-811.
83. MacSween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (3): 131-140.
84. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JS. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (11): 4152-4154.



# Capítulo 11

---

## Rubéola

*Kioko Takei e Yoshimi Imoto Yamamoto*

- Introdução, 143
- Epidemiologia, 143
- Aspectos clínicos, 145
- Vírus da rubéola e seus antígenos, 146
- Resposta imune à infecção e interpretação clínica dos resultados, 147
- Diagnóstico laboratorial, 150
- Referências bibliográficas, 152



## ► Introdução

A primeira descrição da rubéola foi feita no início do século 18 por George Maton, na Inglaterra, como sendo uma doença discreta caracterizada por exantema maculopapular, adenopatia, pouca ou nenhuma febre. O nome rubéola foi proposto em 1866 por Henry Veale, para designar a doença até então conhecida por *Rotelm* ou *German measles*, que significava “similar ao sarampo”.<sup>1</sup>

A doença não despertou grande interesse, sendo considerada uma infecção da infância, sem consequências mais graves. A primeira descrição do efeito teratogênico do vírus da rubéola (VR) foi feita em 1941, por Norman McAlister Gregg, em sua publicação *Congenital cataract following German measles in the mother*. Nesse trabalho, o autor relata o súbito aumento da catarata congênita em crianças nascidas de mães que haviam sido acometidas pela rubéola no início da gravidez, durante uma grande epidemia ocorrida na Austrália.<sup>1</sup> Outras anormalidades oculares, assim como alta frequência de crianças com doença cardíaca congênita e surdez sensorineural, foram também descritas.<sup>1,2</sup> Atualmente, a síndrome da rubéola congênita (SRC) compreende um amplo espectro de manifestações clínicas, cujo conhecimento se amplia a cada nova epidemia.

O isolamento do vírus em 1961 por dois grupos de investigadores americanos possibilitou o rápido conhecimento de história natural, viremia, excreção viral, aspectos clínicos e resposta imunológica desta infecção. A maioria dos conhecimentos sobre a síndrome da rubéola congênita foi adquirida após grandes epidemias, como a que ocorreu em 1964 no oeste europeu e nos EUA, onde a rubéola congênita pôde, pela primeira vez, ser estudada com suporte no diagnóstico viral específico.<sup>1</sup>

O marco mais importante na história da rubéola foi a produção e o licenciamento de vacinas antirrubéola, o que mudou radicalmente o padrão epidemiológico desta infecção, dividindo a história da rubéola em eras pré e pós-vacina. O Quadro 11.1 mostra o cronograma de eventos importantes no controle da rubéola.

**Quadro 11.1 - Cronograma de eventos importantes no controle da rubéola e da síndrome de rubéola congênita (SRC).**

1866	Henry Veale propôs o nome rubéola
1941	Norman McAlister Gregg descreveu os efeitos teratogênicos da rubéola na gravidez e características clínicas da rubéola congênita
1961	Identificação e cultura do vírus
1962-64	Pandemia de rubéola nos EUA e na Europa
1969	Foram licenciadas as primeiras vacinas
1970	Introdução de vacinação rotineira nos EUA, para todas as crianças, entre 12 e 15 meses de idade e campanha de vacinação para crianças de 5 a 12 anos entre 1970. Em 1970, a Grã-Bretanha iniciou a vacinação em mulheres na idade pré-puberal
1979	A RA 27/3 foi escolhida como vacina adotada nos EUA
1987-89	Declínio da SRC para menos de 0,1 por 100.000 nascimentos vivos nos EUA (queda de 99% desde a introdução da vacina)
1992	No estado de São Paulo, houve a introdução do programa de controle da rubéola e da SRC, que incluía a vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) no calendário vacinal de rotina aos 15 meses e tornava compulsória a notificação da rubéola e da SRC
2008	Campanha nacional de vacinação para eliminação da rubéola no Brasil

Fonte: Cooper LZ, 1985;<sup>1</sup> Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 1992.<sup>3</sup>

## ► Epidemiologia

Estudos epidemiológicos da rubéola são dificultados pela ocorrência de infecções não aparentes em mais da metade dos casos. As manifestações clínicas, quando ocorrem, são em geral discretas, inespecíficas e não notificadas por dispensarem cuidados médicos especiais. Além disso, casos esporádicos de rubéola podem não ser devidamente diagnosticados.

Nos períodos anteriores à vacina, as epidemias eram cíclicas, com intervalos regulares de 5 a 9 anos, provavelmente quando o acúmulo de indivíduos suscetíveis alcançava valores acima de 15%. No entanto, epidemias de proporções inesperadas foram registradas na Inglaterra em 1940 e, nos EUA, em 1964.<sup>4</sup>

A população mais acometida, nos países sem um programa de prevenção, é a de crianças entre 5 e 9 anos, sendo rara a ocorrência no primeiro ano de vida. No Brasil, um estudo realizado entre 1970 e 1983, no Rio de Janeiro, por Schatzmayr, verificou que 70% da população de crianças com 9 anos de idade já apresentavam anticorpos com títulos significativos no teste de inibição da hemaglutinação (IHA). Nas mulheres em idade fértil, a soropositividade foi de 80 a 90%.<sup>5</sup>

### ▪ Transmissão

#### *Transmissão pós-natal*

A transmissão da rubéola pode ocorrer durante todo o ano, principalmente no inverno e na primavera.<sup>3</sup> O ser humano é provavelmente o único hospedeiro do vírus da rubéola.<sup>6</sup> A porta de entrada do vírus é a via respiratória superior, disseminando-se em seguida aos nódulos linfáticos regionais, por meio da viremia transitória ou pelo sistema linfático. Após 7 a 9 dias, o vírus é liberado na circulação, alcançando múltiplos tecidos, inclusive a placenta. A excreção viral inicia-se no 9º ao 11º dia da infecção, principalmente pelo trato respiratório e pelos rins, mas também pela cérvice uterina, pelo trato gastrointestinal e por outros sítios. Laboratorialmente, o vírus pode ser detectado nestes materiais, principalmente na nasofaringe, sendo isolado com maior frequência entre 7 dias antes e 14 dias depois do início da doença. O pico da viremia ocorre do 10º ao 17º dia da infecção, imediatamente antes do exantema. O vírus desaparece do sangue poucos dias depois, quando os anticorpos se tornam detectáveis; porém, podem persistir dentro de linfócitos e monócitos por 1 a 4 semanas.<sup>7</sup> A infecção é contagiosa durante o período prodromico até cerca de 7 dias após o exantema. Atualmente, por meio de técnicas moleculares de elevada sensibilidade, a excreção viral tem sido demonstrada por períodos maiores, principalmente no fluido oral e no material de nasofaringe.

#### *Transmissão pré-natal*

A transmissão materno-fetal pode ocorrer durante todo o período de gestação, sendo mais grave no início da gravidez. Estudos realizados por Miller *et al.*<sup>8</sup> em 258 crianças nascidas de mães com rubéola sintomática e assintomática adquirida durante a gravidez mostraram as seguintes taxas de recém-nascidos infectados, de acordo com o período gestacional: 67 a 90% no primeiro trimestre; 25 a 67% no segundo trimestre e 35 a 100% no terceiro trimestre. Apesar desse alto índice de infecções congênitas, as anomalias nos recém-nascidos foram observadas somente naqueles acometidos no primeiro trimestre de gravidez, como se observa no Quadro 11.2.<sup>8</sup> A causa da variação na taxa de transmissão de acordo com o tempo de gestação é desconhecida; porém, modificação na estrutura placentária possivelmente está envolvida.



**Quadro 11.2 - Taxas de infecções congênitas, resultantes de infecções maternas sintomáticas e assintomáticas, de acordo com os estágios da gravidez e as taxas de anomalias congênitas observadas em crianças infectadas acompanhadas durante 26 meses.**

Estágio da gravidez (semanas)	Número de crianças estudadas	Soropositivos (%)	Número de crianças acompanhadas	Risco estimado defeitos congênitos (%)
Antes de 11	10	90	9	90
11 a 12	6	67	4	33
13 a 14	18	06	12	11
15 a 16	36	47	14	24
17 a 18	33	39	10	—
19 a 20	59	34	53	—
23 a 26	32	25	—	—
27 a 30	31	35	—	—
31 a 36	25	60	—	—
Após 36	8	100	—	—
Total	258	45	102	—

Adaptado de Miller et al.<sup>8</sup>

Crianças congenitamente infectadas por VR podem excretar o vírus nas secreções respiratórias e na urina por meses ou anos, sendo, portanto, contagiosas durante todo esse período.<sup>9</sup>

## ■ Prevenção | Vacinação antirrubéola

A imunização ativa é o único meio eficaz de prevenção da rubéola e da SRC. A vacinação antirrubéola, visando à prevenção da rubéola congênita, foi introduzida em alguns países entre 1969 e 1970, imediatamente após o licenciamento das primeiras vacinas. A estratégia de vacinação nos EUA e no Canadá visava à eliminação do vírus da rubéola na população e, consequentemente, a proteção dos indivíduos suscetíveis. Este método, chamado indireto, tinha como população-alvo crianças de ambos os sexos de 12 a 15 meses de idade.<sup>10</sup> O método direto, adotado a partir de 1970 na Grã-Bretanha e nos países da Europa, visava à imunização seletiva da população feminina na idade escolar e principalmente na idade fértil.<sup>11</sup> Em 1976, a vacinação foi estendida a todas as idades, e a prevalência de indivíduos suscetíveis registrou importante queda.

A vacina contra rubéola consiste em vírus vivo atenuado por meio de passagens sucessivas em cultivos celulares. As primeiras vacinas licenciadas foram RA 27/3, Cendehill, Takahashi, Matsuura e HP-77, em 1969.<sup>12</sup> Em 1971, a vacina antirrubéola foi combinada com a de sarampo e caxumba, constituindo a vacina tríplice viral, também conhecida como MMR, iniciais em inglês de *measles, mumps and rubella*. Licenciada no mesmo ano nos EUA, esta vacina contém a cepa RA 27/3 do vírus da rubéola que tem a vantagem de apresentar menor frequência de artropatias pós-vacinação.<sup>3,13</sup> Em 1982, a vacina tríplice viral foi introduzida para ambos os sexos, e a imunização passou a ser feita em duas etapas: a primeira em torno de 1 ano e a segunda na idade escolar.<sup>14</sup> No período de 1966 a 1988, a incidência da rubéola registrou queda de 99%.<sup>11</sup> Contudo, entre 1989 e 1991, rubéola e SRC ressurgiram nos EUA, em comunidades segregadas não vacinadas, como as de alguns grupos religiosos,<sup>15</sup> declinando novamente a taxas baixas no período de 1992 a 1996.<sup>16</sup>

No Brasil, a vacinação contra rubéola foi implantada gradativamente na forma de campanhas estaduais, iniciando-se em 1992 e completada em 2000.<sup>17</sup> No estado de São Paulo, o Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria do Estado

da Saúde de São Paulo (CVE/SES) introduziu, em 1992, o Programa de Controle da Rubéola e da SRC, que consistia em uma campanha inicial de vacinação de todas as crianças entre 1 e 10 anos de idade, independentemente da história anterior de doença ou de vacina, a substituição, no calendário vacinal, de vacina monovalente contra sarampo pela tríplice viral, aplicada aos 15 meses de idade, e a notificação compulsória da rubéola e da SRC.<sup>3</sup>

A vacina tríplice viral utilizada no Programa Nacional de Imunização contém a cepa Wistar RA 27/3 do vírus da rubéola, a qual é obtida a partir de um feto infectado com rubéola, sendo a mais utilizada no mundo. As passagens sucessivas em cultura de células atenuam o vírus, que perde a sua patogenicidade, porém preservam a capacidade de replicação e a imunogenicidade.<sup>17</sup>

A via de administração mais eficaz é a subcutânea, embora a via intranasal seja também utilizada.<sup>18</sup> Níveis máximos de anticorpos são observados entre o 14º e o 21º dia após a vacinação. A eficácia da vacina é muito alta e a soroconversão em níveis protetores ocorre entre 95 e 99% dos vacinados. A vacinação confere imunidade duradoura, provavelmente por toda a vida.<sup>17,18</sup>

A vacina da rubéola é bastante segura, e as contraindicações são restritas a poucas condições, como: antecedente de reação anafilática grave, imunossupressão, doenças agudas graves e gestantes. Cerca de 5 a 15% das pessoas vacinadas suscetíveis podem apresentar alguns efeitos adversos.<sup>15</sup>

Entre os efeitos colaterais da vacina contra rubéola, o principal é o acometimento articular com artralgia e artrite, que pode ocorrer em cerca de 25 a 40% dos adultos, principalmente mulheres. São geralmente agudas e transitórias, com raras recorrências. Outros efeitos também podem ocorrer, tais como febre baixa, linfadenopatia e exantema (Quadro 11.3).<sup>7,19</sup>

As vacinas sintéticas ou recombinantes, empregando apenas as regiões antigênicas envolvidas na imunidade, tanto humoral como celular, têm sido estudadas para diminuir os efeitos colaterais.<sup>20</sup>

Recentemente, uma vacina tetravalente, denominada MMRV (sigla em inglês de *measles, mumps, rubella, varicella*), que adiciona aos três vírus da tríplice viral o vírus atenuado da varicela-zóster, tem sido introduzida como alternativa à administração de MMR e vacina da varicela, concomitantemente.



**Quadro 11.3 - Principais eventos adversos após a vacina tríplice viral contendo a cepa RA 27/3 do vírus da rubéola.**

Evento adverso	Tempo pós-aplicação	Frequência
Artralgia e/ou artrite	1 a 3 semanas	25% das mulheres
Febre $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	5 a 12 dias	5 a 15% dos primovacinados
Exantema	7 a 12 dias	5% dos primovacinados
Cefaleia, irritabilidade, febre baixa, conjuntivite e/ou manifestações catarrais	5 a 12 dias	0,5 a 4% dos primovacinados
Linfadenopatia	7 a 21 dias	< 1% dos primovacinados
Púrpura trombocitopênica	2 a 3 semanas	1/30.000 a 1/40.000
Reações de hipersensibilidade*	24 a 72 h	Raras
Reação anafilática**	Primeira hora	Extremamente raras

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde, 2007<sup>19</sup>. \*Urticárias no local ou, mais raramente, em outras áreas do corpo. \*\*Urticárias, sibilos, laringospasmo, edema de lábios, hipotensão e choque.

Essa vacina tem mostrado alto índice de taxa de soroconversão a todos os quatro componentes antigênicos, sendo respectivamente de 94,5%, 96,1%, 99,7% e 95,5% quando administrada em uma única dose e de 98,3%, 99,4%, 99,7 e 99,7%, quando administrada em duas doses, uma no primeiro ano de vida e a outra no segundo ano.<sup>21,22</sup> A maioria dos autores considera que a imunogenicidade da vacina, administrada em uma única dose aos 9 a 24 meses de idade, pode ser considerada equivalente à administração em duas doses. A vacina tetravalente é bem tolerada, pois não têm sido verificados efeitos colaterais adicionais aos observados nas vacinas MMR e na de varicela.<sup>21-23</sup>

### Vacinação antirrubéola em grávidas

O vírus atenuado da rubéola utilizado na vacina não é teratogênico, apesar de apresentar capacidade de atravessar a placenta e infectar o feto.<sup>23</sup> Estudos realizados na Grã-Bretanha e nos EUA demonstraram que a vacina contra rubéola é inócua para o feto, mesmo quando os testes sorológicos indicavam que o feto havia sido infectado por esse vírus.<sup>24</sup> Durante a campanha de vacinação nos países das Américas, realizada em 2006, mais de 29 mil gestantes vacinadas inadvertidamente (GVI) foram identificadas, mas nenhum caso de SRC foi detectado entre os recém-nascidos dessas mães.<sup>17</sup>

Apesar disso, sendo o risco diferente de zero, a vacinação contra rubéola é contraindicada durante a gravidez. A recomendação para evitar a gravidez, até então de 3 meses, passou, a partir de 2001, para 1 mês após a vacinação contra rubéola. A vacinação inadvertida de gestantes não é motivo para interrupção da gravidez, por não haver risco comprovado de embriopatia fetal, mas é imprescindível fazer o registro e o acompanhamento destas mulheres, por meio de protocolo definido pelo Ministério da Saúde.<sup>17</sup> Resumidamente, este protocolo visa acompanhar as GVI até 3 meses de gestação, mulheres que receberam a vacina e engravidaram até 30 dias após a data do recebimento da vacina e recém-nascidos de GVI suscetível para rubéola. A gestante é considerada suscetível se apresentar IgM positiva (independentemente do resultado de IgG) na amostra coletada imediatamente após a suspeita de vacinação inadvertida e IgM e IgG positivas na segunda coleta 20 a 30 dias após a primeira amostra. Essa gestante deve ser acompanhada, e a coleta de sangue do recém-nascido é obrigatória, preferencialmente ainda na maternidade.

Se o recém-nascido apresentar IgM positiva, este é considerado infectado congenitamente e a coleta da secreção de nasofaringe é necessária para identificar o vírus e diferenciar o vírus selvagem do vacinal. A criança será acompanhada em serviços de referência para diversas especialidades médicas

para avaliação de SRC ou malformação congênita. A sorologia deve ser realizada após 6 meses para a conclusão do diagnóstico. A mesma conduta é realizada para crianças IgG-positivas ao nascer e que persistem positivas aos 6 meses de idade. Após avaliação e classificação final do caso, conforme estabelece o protocolo, define-se como SRC “toda criança menor de 1 ano que apresentar catarata congênita unilateral ou bilateral e/ou glaucoma congênito e/ou déficit auditivo e/ou malformação cardíaca (persistência do canal arterial, estenose aórtica, estenose da artéria pulmonar e cardiopatia não especificada) associadas ao vírus da rubéola”.<sup>17</sup>

### Erradicação da rubéola nas Américas

Após a erradicação da varíola, da poliomielite e da circulação do vírus do sarampo, a 44ª reunião do Conselho Diretor da Organização Pan-Americana de Saúde, realizada em 2007, estabeleceu como meta a “Erradicação da Rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita (SRC)” nas Américas no ano 2010.<sup>17</sup>

No Brasil, para alcançar essa meta, uma campanha nacional de vacinação para homens e mulheres dos grupos de idade identificados com suscetibilidade para a rubéola foi realizada em 2008, visando também à total erradicação do sarampo. O objetivo é esgotar a totalidade da população ainda suscetível e, com isso, interromper a transmissão endêmica do vírus da rubéola no país.<sup>17</sup>

## ► Aspectos clínicos

### ▪ Rubéola pós-natal

A rubéola pós-natal típica é, em geral, uma doença benigna, autolimitada, altamente contagiosa, com manifestações febris e exantema maculopapular de 2 a 3 dias de duração, que se inicia pela face e pelo pescoço, alastrando-se rapidamente para o tronco e as extremidades, sempre no sentido cranio-caudal. A rubéola pode ser subclínica em 1/3 a 2/3 dos casos. Em crianças, geralmente o exantema é o primeiro sinal observado. Em adolescentes e adultos, a erupção é precedida por um período prodromico de 1 a 5 dias caracterizado por febre baixa, cefaleia, mal-estar, anorexia, conjuntivite leve, coriza e dor de garganta. A linfadenopatia suboccipital, retroauricular e cervical resultante da intensa multiplicação viral nesses sítios auxilia no diagnóstico, porém, não é patognomônica. Esses sintomas desaparecem logo após o exantema quando os anticorpos tornam-se detectáveis.<sup>7</sup> A recuperação do paciente é quase sempre total. Artralgias e artrites são as complicações mais frequentes da infecção naturalmente adquirida ou



após a vacinação, particularmente em adolescentes e mulheres jovens, ocorrendo em cerca de 10 a 40% dos casos.<sup>9</sup> São transitórias, de 5 a 10 dias de duração e sem sequelas, porém, em alguns pacientes, podem ser recorrentes ou persistir por anos. A patogênese dessa artrite parece estar relacionada com a persistência do vírus da rubéola por períodos prolongados, de meses a anos, após infecção. De fato, o vírus da rubéola tem sido isolado de linfócitos circulantes e do fluido sinovial de alguns desses pacientes.<sup>7</sup>

Outras complicações, como a trombocitopenia, são relativamente comuns, porém raras vezes têm importância clínica. A meningoencefalite de curta duração pode ocorrer 1 a 6 dias após o exantema em 1:6.000 casos, sendo fatal em 20% destes. Infecções por adenovírus, enterovírus e vírus Epstein-Barr podem mimetizar a rubéola em razão de exantema, febre e linfadenopatia. Fora do período epidêmico, o diagnóstico da rubéola deve ser feito avaliando-se, em conjunto, os dados clínicos e sorológicos.<sup>9</sup>

### ■ Rubéola congênita

A rubéola congênita é, atualmente, uma doença rara nos países onde o programa de vacinação é eficiente. As manifestações clínicas da rubéola congênita são bastante variadas, abrangendo desde recém-nascidos aparentemente saudáveis a gravemente acometidos com múltiplas anomalias. Infecções congênitas subclínicas ou assintomáticas com manifestações que se tornam aparentes nos primeiros anos de vida ou que se desenvolvem posteriormente podem ocorrer em 2/3 dos casos. Por isso, a incidência precisa da rubéola congênita é difícil de ser estimada, sendo necessário o acompanhamento dos recém-nascidos suspeitos por períodos de 2 a 5 anos.<sup>7,25</sup> O efeito teratogênico do vírus da rubéola sobre o feto é tanto maior quanto mais precoce for a infecção durante a gravidez. Assim, quando o vírus acomete o feto no primeiro trimestre de gravidez, pode produzir uma infecção maciça e devastadora com acometimento de múltiplos órgãos e resultar em aborto, nascimento prematuro, recém-nascido com uma ou múltiplas anomalias como a catarata, surdez e cardiopatias congênitas, produzindo a chamada síndrome da rubéola congênita (SRC).<sup>1,6</sup> Presume-se que as lesões fetoplacentárias se devam ao efeito citopático do vírus em replicação.<sup>26</sup> A inibição da mitose causada pelo vírus da rubéola pode, em parte, explicar o retardo e a desorganização da organogênese que se expressa como recém-nascido de baixo peso com anomalias estruturais no olho, coração, cérebro e em outros órgãos.<sup>1</sup> Após o período da organogênese, o vírus da rubéola pode ainda continuar infectando todos os órgãos e tecidos do feto e do recém-nascido, podendo resultar em hepatite, pneumonia, pancreatite, miocardite, meningite e outros. Ao contrário da rubéola pós-natal, a rubéola congênita caracteriza-se pela infecção crônica, que persiste por todo o período intrauterino até meses a anos depois do nascimento. Essa persistência do vírus por anos pode ainda produzir lesões progressivas e patologias que envolvem mecanismos autoimunes com formação de imunocomplexos com a participação de IgG antirrubéola.<sup>27</sup> Para facilitar o estudo, as manifestações da síndrome da rubéola congênita podem ser agrupadas em três categorias:

- Manifestações transitórias do recém-nascido, como, por exemplo: púrpura trombocitopênica neonatal, anemia hemolítica, hepatites e outros, que regredem espontaneamente em 2/3 dos casos

- Manifestações permanentes, como surdez, doença cardíaca congênita, catarata, glaucoma, retinopatia pigmentar, retardamento mental etc.
- Manifestações tardias, como diabetes melito, hipo e hipertireoidismo, retinopatias e uma doença neurodegenerativa rara, a pan-encefalite. A manifestação tardia mais predominante é o diabetes melito insulino dependente, que ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes com rubéola congênita, na idade adulta.<sup>28</sup> Essa prevalência é 100 a 200 vezes maior do que a observada na população geral. As causas dessas manifestações são pouco conhecidas; porém, postula-se que estejam associadas a algumas anormalidades da célula T ou a condições que aumentem a suscetibilidade preexistente. A disfunção tireoidiana afeta cerca de 5% dos pacientes, podendo manifestar-se como hiper ou hipotireoidismo; parece estar associada ao mecanismo autoimune.<sup>28</sup>

O vírus pode ser isolado de garganta, urina, conjuntiva, medula óssea, liquor e outros sítios de recém-nascidos vivos, bem como da maioria dos órgãos em fetos obtidos de necropsias. A excreção viral persistente pode ser observada nos recém-nascidos infectados: em aproximadamente 80% destes no primeiro mês de vida; 62% entre 1 e 4 meses; 33% entre 5 e 8 meses; 11% entre 9 e 12 meses e 3% até o segundo ano de vida. A permanência do vírus ou de seu antígeno por muitos anos tem sido relatada, na literatura, em tecidos como o das lentes, da tireoide e do cérebro.<sup>1,27,29</sup> Essa excreção prolongada, consequente à infecção crônica, é observada unicamente na forma congênita e é atribuída, em parte, à tolerância imunológica seletiva ao antígeno E1 do vírus da rubéola, que é associado à proteção, consequente à exposição do sistema imune imaturo do feto muito precocemente na vida intrauterina. A deficiência na resposta imune celular e a incapacidade em sintetizar IgG de alta afinidade podem também ser a causa da falha na eliminação do vírus. A coexistência do vírus da rubéola e de altos títulos de anticorpos maternos neutralizantes constitui um paradoxo.<sup>27</sup>

A síndrome da rubéola congênita associada à reinfeção materna é rara, sendo praticamente nula em mães que tiveram, no passado, a rubéola naturalmente adquirida.<sup>1,8</sup> Contudo, a reinfeção de mães previamente vacinadas pode raramente dar origem a crianças com a síndrome da rubéola congênita.

## ► Vírus da rubéola e seus antígenos

O vírus da rubéola (VR) é classificado como o único membro do gênero *Rubivirus*, pertencente à família *Togaviridae*. Apenas um sorotipo de VR foi descrito até o momento, apesar de existirem algumas diferenças biológicas entre as cepas.<sup>30</sup>

A partícula viral é, em geral, esférica e apresenta de 50 a 70 nm de diâmetro. Consiste estruturalmente em nucleocápside icosaédrico (core) contendo RNA genômico de 40S, associado à proteína do capsídio (a proteína C, de 33 kDa) e envolto por envelope lipídico constituído de duas glicoproteínas virais E<sub>1</sub> (58 kDa) e E<sub>2</sub> (42 a 47 kDa).<sup>31-33</sup> No envelope viral, apresenta projeções ou espículas de 5 a 6 nm, que constituem as hemaglutininas.<sup>28</sup>

As células infectadas com VR contêm mRNA subgenômico de 24S, cuja transcrição produz uma poliproteína precursora de 110 kDa, que resulta, após clivagem proteolítica, sequencialmente, nas proteínas E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub> e C.<sup>31,34</sup>



O vírus da rubéola apresenta o seu RNA altamente conservado. Entretanto, as cepas circulantes no mundo podem apresentar diferenças de até 10% na sequência de nucleotídeos que codificam E<sub>1</sub>, o que torna possível a classificação em dois genótipos principais e vários subgenótipos.<sup>35</sup> Nos países das Américas, o tipo C é o genótipo mais frequente, seguido pelo tipo 1E.<sup>17</sup>

A glicoproteína E<sub>1</sub> é o antígeno mais importante do VR e constitui o alvo principal na resposta imune, tanto humoral quanto celular. Assim, o anti-E<sub>1</sub> é o anticorpo predominante na infecção adquirida naturalmente ou após a imunização.<sup>31,36</sup> E<sub>1</sub> apresenta pelo menos 3 a 6 epitopos independentes com atividades neutralizante (NT) e hemaglutinante (HT).<sup>30,31</sup> Antigenicamente, a glicoproteína E<sub>1</sub> é altamente conservada, diferindo não mais que 3% entre as diferentes cepas.<sup>28</sup>

A glicoproteína E<sub>2</sub> não é hemaglutinante, mas apresenta pelo menos um epitopo neutralizante. É altamente glicosilada e muito heterogênea, produzindo na eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) uma migração difusa, abrangendo bandas de peso molecular de 42 kDa (E2a) e 47 kDa (E2b),<sup>37</sup> mas o seu papel biológico ainda não está bem definido.<sup>30,32,37</sup>

A proteína C não é glicosilada, e sua função, do ponto de vista imunológico, é pouco conhecida. Parece, entretanto, estar envolvida na transferência do RNA viral para o citoplasma da célula hospedeira.<sup>27</sup> Os anticorpos antiproteína C são encontrados na maioria dos indivíduos expostos ao VR.<sup>32</sup>

## ■ Antígenos

Os antígenos empregados nos testes imunológicos são tradicionalmente obtidos de culturas de célula como Vero, BHK-21, RK-13, Sirc sob a forma de extratos ou lisado de células infectadas por VR. O antígeno purificado de rubéola contém componentes do envelope (com epitopos neutralizantes e hemaglutinantes) e da proteína C. O antígeno hemaglutinante é capaz de aglutinar diversas hemácias como as de pintos recém-nascidos, gansos adultos, pombos e humanos. A presença de íons de cálcio é necessária para que as hemaglutininas se liguem aos receptores encontrados nas hemácias. A capacidade dos anticorpos específicos de inibir essa aglutinação constitui a base do teste de inibição de hemaglutinação (IHA). Entretanto, a produção em larga escala, bem como a purificação do antígeno para torná-lo livre de restos celulares, é tecnicamente complexa, e a utilização de subunidades virais é limitada, em razão da redução da atividade biológica e da sua antigenicidade durante o processo de isolamento.<sup>33,38</sup>

O emprego de antígenos de especificidade definida como os peptídeos sintéticos nos testes sorológicos tem a vantagem de ser altamente sensível e específico. Vários autores têm obtido, com sucesso, a produção de peptídeos sintéticos (PS) com atividades neutralizante e hemaglutinante. A seleção de PS como antígeno nos testes laboratoriais é feita por meio de anticorpos monoclonais que, tendo especificidade definida, ao se ligarem aos PS definem também a especificidade deste antígeno. Os peptídeos sintéticos já vêm sendo utilizados em *kits* imunoenzimáticos para detecção de anticorpos antirrubéola, como, por exemplo, o SP1, também conhecido como BCH-178C, correspondente à sequência 213-239 da glicoproteína E<sub>1</sub> do envelope viral.<sup>39</sup> Esta região é altamente conservada em quase todas as cepas do vírus, incluindo a RA 27/3 da vacina.<sup>38,40,41</sup> Antígenos sintéticos como o correspondente à sequência C 263-275 da proteína C viral têm sido propostos como candidatos à vacina por serem reconhecidos por linfócitos T CD4+ e

CD8+.<sup>18</sup> Alguns peptídeos sintéticos relevantes com atividade neutralizante e hemaglutinante com perspectivas de uso no diagnóstico são mencionados na literatura como: E1<sub>208-239</sub>,<sup>42</sup> E1<sub>245-285</sub>,<sup>43</sup> E1<sub>193-269</sub>,<sup>31</sup> E1<sub>213-239</sub>,<sup>40</sup> E1<sub>324-343</sub><sup>36</sup> etc.

Antígenos recombinantes da região E1 têm sido utilizados em alguns *kits* ELISA comerciais, com elevada sensibilidade. A detecção do IgM foi possível imediatamente após início da doença, e a positividade persistiu por mais de 7 semanas.<sup>44</sup> Antígenos recombinantes expressos em levedura têm demonstrado alta reatividade no ELISA, podendo substituir, com vantagem, o uso do antígeno viral.<sup>45</sup>

## ► Resposta imune à infecção e interpretação clínica dos resultados

### ■ Rubéola pós-natal

A ocorrência de infecções não aparentes, a grande variação na expressão clínica da doença e o mimetismo com exantemas de outras origens tornam a sorologia indispensável no diagnóstico da rubéola e da síndrome da rubéola congênita (SRC).

O isolamento do vírus é complexo, demorado e de alto custo, limitando-se apenas aos casos de extrema necessidade. O diagnóstico laboratorial é fundamentalmente apoiado na detecção de anticorpos antirrubéola.

Na infecção primária, os anticorpos da classe M são, em geral, detectados muito precocemente, após o início da doença, sendo encontrados em um a dois terços dos pacientes nos primeiros 3 dias e em quase todos os pacientes no decorrer do primeiro mês. Alcançam níveis máximos entre 7 e 10 dias pelo teste de inibição da hemaglutinação ou entre 4 e 35 dias por ELISA.<sup>46,47</sup> A negatificação do teste para IgM também depende da sensibilidade da técnica empregada. Pela técnica de inibição da hemaglutinação, anticorpos IgM antirrubéola permanecem positivos por curto período, em geral entre 4 e 6 semanas e, raras vezes, por 3 meses.<sup>47</sup> Já no ELISA, resultados positivos podem ser observados por 2 a 6 meses, ocorrendo raros casos até 1 ano.<sup>47</sup> Há, no entanto, relatos isolados na literatura de IgM persistente por períodos prolongados de anos.<sup>48</sup>

O emprego de testes cada vez mais sensíveis para a detecção de IgM específica, como, por exemplo, o ELISA por captura de IgM, tornou a interpretação clínica dos resultados mais complexa em razão da persistência deste anticorpo, por muito tempo após a infecção primária e a sua detecção nas reinfecções.

Os anticorpos antirrubéola da classe IgG são altamente eficazes na proteção do indivíduo. São detectáveis no soro a partir de 3 a 4 dias, após o início da doença, alcançando níveis máximos em 2 semanas. Em seguida, declinam lentamente, porém, persistem por toda a vida, na maioria dos indivíduos. Em casos raros, o nível de IgG chega ao limiar de detecção ou até a negatificação.<sup>48</sup>

Anticorpos IgG apresentam baixa avidéz no início da infecção, até 3 a 5 meses, seguidos de gradual aumento à medida que o tempo decorre. Para fins de diagnóstico da infecção recente, a detecção de IgG de baixa avidéz deve ser feita em amostras obtidas até 2 a 4 meses após o início da doença. É especialmente útil na distinção entre a infecção recente da antiga, quando os títulos de anticorpos já se encontram em níveis máximos nos métodos sorológicos convencionais.<sup>48,49</sup> Além disso, quando se utilizam métodos de sensibilidade muito alta, os anticorpos IgM-específicos podem ser detectados



tanto na infecção primária quanto na reinfecção, e, neste caso, a avidéz da IgG pode definir o diagnóstico. A avidéz é baixa na infecção primária e alta na reinfecção.

Na rubéola, a subclasse de IgG predominante é IgG1, sendo encontrada sempre que a amostra for positiva para IgG. IgG2 é praticamente indetectável e IgG4 somente é observada em alguns indivíduos, em níveis muito baixos.<sup>50</sup> IgG3 tem sido associada por alguns autores à fase recente da infecção, sendo encontrada entre 2 e 6 semanas após o início da doença, dados esses não confirmados por outros autores.<sup>50</sup>

Os anticorpos antirrubéola da classe IgA são detectados no início da doença, logo depois de IgM. Alcançam níveis máximos em torno de 1 semana e tornam-se indetectáveis em períodos muito variáveis, dependendo do paciente. A sua presença pode ser transitória ou persistir por meses a anos.<sup>51</sup>

O diagnóstico da rubéola pós-natal, a coleta do sangue no período adequado durante a infecção é fator determinante para a interpretação correta dos resultados da sorologia. A primeira amostra deve ser colhida imediatamente após os sintomas, antes que os anticorpos se tornem detectáveis ou assim que houver suspeita de contato com caso confirmado ou suspeito de rubéola. Resultado positivo para anticorpos totais ou IgG antirrubéola com título significativo, na ausência de anticorpos IgM, pode ser interpretado como imunidade. Mas, se o resultado for negativo ou no limiar de detecção, uma segunda amostra deve ser coletada 2 semanas após a data da primeira e as duas ensaiadas na mesma rotina. A segunda amostra é também necessária quando a primeira tiver sido obtida poucos dias após o início dos sintomas, já no período de soroconversão. A observação da soroconversão ou a elevação de 4 vezes no título da 2ª amostra em relação à primeira, associada à presença de IgM, torna possível o diagnóstico sorológico da rubéola pós-natal. Resultados idênticos entre as duas amostras, associados ao resultado negativo para IgM, são interpretados como ausência de infecção recente pelo VR. O resultado será considerado inconclusivo se a segunda amostra apresentar título apenas duas vezes maior que a primeira. Neste caso, uma terceira amostra deve ser coletada após 10 a 14 dias da data da segunda e as três ensaiadas juntas, na mesma rotina. Segundo CVE da Secretaria de Estado da Saúde, os Laboratórios de Referência de Saúde Pública utilizam, rotineiramente, o teste ELISA para detecção de anticorpos IgM para rubéola, em todos os suspeitos em amostra única de sangue, coletada no 5º ao 28º dia do início do exantema.<sup>52</sup>

Em gestantes expostas a caso confirmado ou suspeito de rubéola, a segunda amostra deve ser coletada independentemente do resultado da primeira, para investigar a possibilidade da reinfecção. Se as duas amostras forem positivas, com título significativamente superior na segunda, independentemente da presença ou não de IgM, pode-se interpretar como provável reinfecção. Neste caso, é muito importante assegurar-se de que a primeira amostra realmente tenha sido coletada imediatamente após o contato. No caso de o teste ser realizado com objetivo único da determinação da imunidade, como nos exames pré-natais, é suficiente a soropositividade em uma única amostra pela técnica de inibição da hemaglutinação (IHA) ou ELISA. Títulos iguais ou superiores a 8 UI/mL por IHA ou 10 UI/mL por ELISA são considerados como de imunidade.

## ▪ Vacinados

A resposta imunológica à vacina antirrubéola é bastante semelhante à da infecção natural; porém, os títulos de IgG e IgM são geralmente mais baixos. Anticorpos da classe M são

detectados na maioria dos vacinados após 2 a 3 semanas; em seguida, há gradual declínio, persistindo por 2 a 3 meses em cerca de 1/3 dos indivíduos.<sup>53</sup>

Anticorpos da classe G são detectados entre 3 e 4 semanas após vacinação em 98 a 99% dos vacinados,<sup>54</sup> podendo neles permanecer durante longos anos ou, na maioria dos indivíduos, por toda a vida.<sup>55,56</sup> Com o decorrer dos anos, declínio lento e gradual destes anticorpos leva alguns indivíduos a apresentarem títulos inferiores a 8 ou 10 UI/mL, tornando-os potencialmente suscetíveis à reinfecção.<sup>55</sup> Nos países em que não há um programa adequado de controle, a circulação do vírus da rubéola na população auxilia na manutenção dos níveis de anticorpos específicos.

IgA específica pode ser observada no lavado de nasofaringe 3 semanas após vacinação, podendo persistir por 3 a 6 anos e, raramente, até 10 a 12 anos.<sup>57</sup>

## ▪ Reinfecção

A reinfecção por VR pode ocorrer tanto em indivíduos que já tiveram rubéola naturalmente como em vacinados, e é, na maioria das vezes, assintomática. Na reinfecção de gestantes com história anterior de rubéola, o risco de transmissão para o feto é praticamente nulo.<sup>58</sup> Sorologicamente, é diagnosticada pela presença de anticorpos antirrubéola antes da exposição à fonte infectante e pela elevação dos títulos em no mínimo 4 vezes. Anticorpos específicos das classes M e A geralmente não são detectados, porém IgM podem estar presentes em geral em níveis reduzidos.<sup>58,59</sup>

A reinfecção de indivíduos vacinados é muito mais frequente, sendo também, na maioria dos casos, assintomática. Foi observado que cerca de 10% dos indivíduos vacinados podem ser reinfetados quando expostos a surtos de rubéola.<sup>60,61</sup> Achados de IgM são muito mais comuns na reinfecção de indivíduos vacinados do que na reinfecção de indivíduos infectados naturalmente, em razão de a imunidade decorrente da vacinação ser menos efetiva do que a induzida pela infecção natural.<sup>58,61</sup> Apesar disso, o risco para o feto, quando a reinfecção acomete gestantes, é baixo. Há, no entanto, raros relatos na literatura de crianças com SRC nascidas de mulheres soropositivas, vacinadas no passado e reinfetadas durante a gestação.

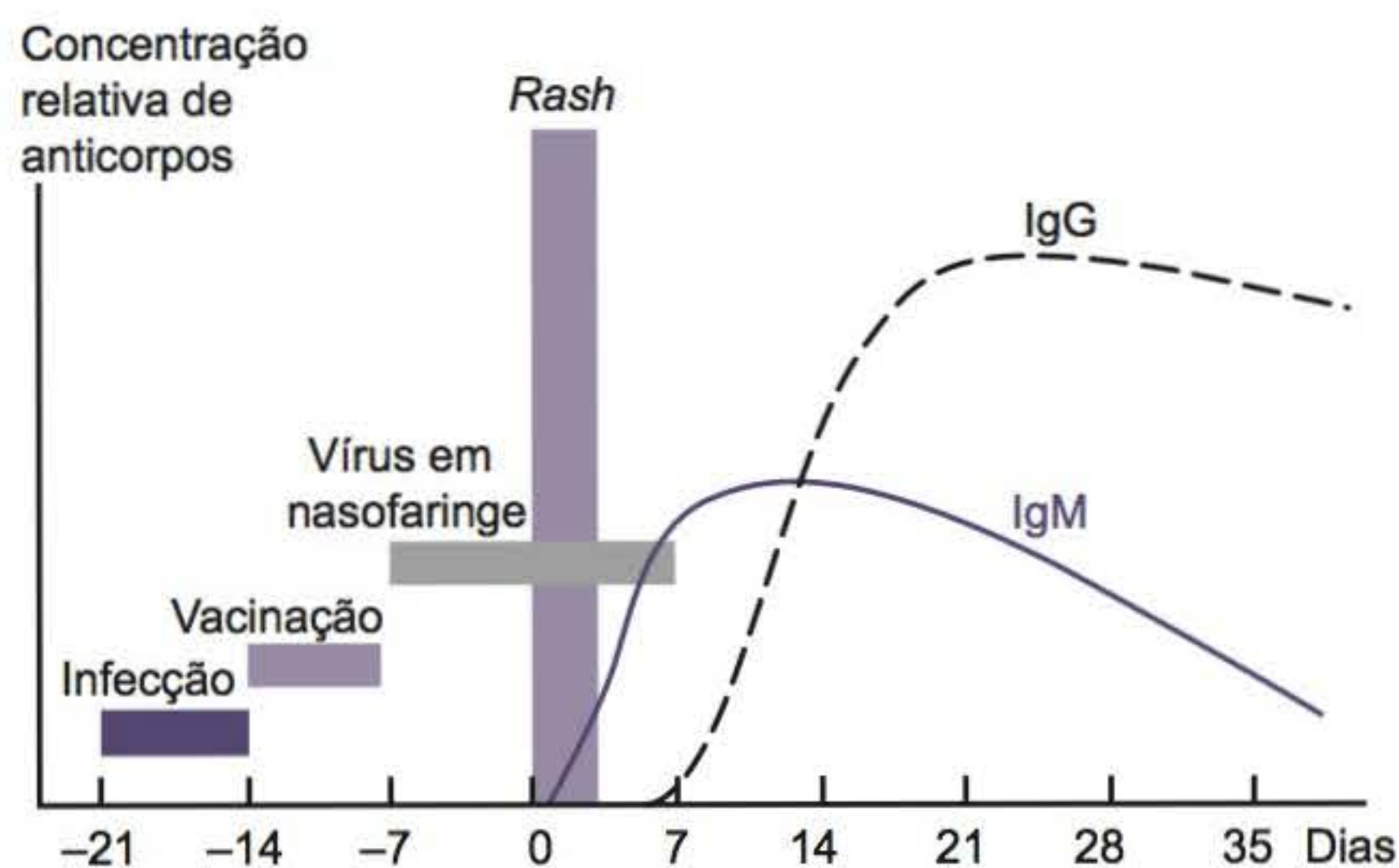
A reinfecção e a infecção primária subclínica por VR são difíceis de serem diferenciadas quando não se dispõe de amostra de soro ou resultado sorológico anterior à exposição. Em ambos os casos, verifica-se a elevação nos títulos de anticorpos antirrubéola, podendo estar acompanhado de IgM. Neste caso, o teste de avidéz de IgG pode ser de grande valia, pois a avidéz de IgG é baixa na infecção primária e alta nas reinfecções.<sup>62,63</sup> O perfil sorológico de uma infecção primária por vírus da rubéola pode ser observado na Figura 11.1.

Vale ressaltar que a interpretação dos resultados sorológicos deve ser feita sempre em associação a outros dados, tais como clínicos e epidemiológicos, ou outros exames laboratoriais.

## ▪ Rubéola congênita

Na rubéola congênita, o padrão de resposta imunológica é peculiar e único. Esta infecção caracteriza-se por prolongada produção de anticorpos IgM; lenta maturação da avidéz de IgG e respostas imune humoral e celular reduzidas. Esses efeitos, que constituem a expressão imunológica da ação





**Figura 11.1** Perfil sorológico relativo da rubéola pós-natal. Adaptada de Castillo-Solórzano C, 2006. <www.paho.org/immunization>.

do vírus da rubéola sobre o organismo ainda em formação, são mais graves quanto mais precoce é a infecção durante a gravidez.<sup>40,64</sup>

Após a infecção da gestante, o VR dissemina-se pelo sangue e infecta múltiplos tecidos maternos, inclusive a placenta. Com o desenvolvimento da resposta imune materna o vírus desaparece do sangue, mas pode persistir na placenta por meses e infectar o feto em consequência da lesão placentária.<sup>2</sup> No primeiro trimestre, o feto é extremamente suscetível por ser incapaz de montar uma resposta imune adequada. No segundo trimestre, há diminuição no risco em razão da modificação da placenta e da resposta imune do feto que se inicia após 7 a 8 semanas de gestação, quando linfócitos pré-B podem ser observados no fígado fetal. Células produtoras de IgM, IgG e IgA podem ser detectadas a 15, 20 e 30 semanas, respectivamente. Entretanto, a produção de imunoglobulinas só é pronunciada ao redor de 22 a 24 semanas de gestação, e é expressiva apenas para os anticorpos IgM.

A passagem transplacentária de IgG materna, em condições normais, ocorre a partir de 38 dias de gestação, porém em quantidades mínimas até 17 semanas, quando se inicia o aumento na transferência. Contudo, a transferência maciça de IgG só é observada nas últimas semanas de gravidez. Ao termo, o sangue do cordão umbilical apresenta níveis de anticorpos praticamente iguais aos da mãe.<sup>65</sup> Após nascimento, IgG materna transferida passivamente é catabolizada, alcançando níveis mínimos ao redor de 3 a 5 meses, quando anticorpos IgG da criança ainda estão em níveis muito baixos. Em seguida, o gradual aumento na síntese de IgG faz a curva de anticorpos que estava em declínio se elevar novamente. Essa característica, da persistência de IgG pelo período de 6 meses a 1 ano, em vez da negativação que ocorre em recém-nascidos normais, constitui um dos recursos para o diagnóstico da infecção congênita.<sup>64,65</sup>

A produção de IgM na rubéola congênita inicia-se ao redor de 10 semanas de gestação, porém somente alcança níveis detectáveis a partir de 22 semanas. IgM específica continua sendo sintetizada após o nascimento por 2 a 6 meses ou, em raras vezes, até 18 a 24 meses.<sup>58,66</sup> A detecção de anticorpos da classe IgM é a mais importante no diagnóstico intrauterino de infecções congênitas em geral, pois, não sendo capaz de atravessar a barreira placentária, sua presença revela produção fetal. Níveis elevados de IgM total sugerem fortemente infecção congênita.<sup>65</sup> Estudos realizados no sangue de cordão umbilical de fetos de 22 a 26 semanas revelaram a presença de IgM em níveis superiores a 10 mg/dL naqueles infectados e

níveis inferiores a 6 mg/mL em amostras de fetos não infectados. Altos títulos de anticorpos maternos e de IgM produzida pelo feto ocorrem paralelamente com a persistência viral no feto e no recém-nascido. Este paradoxo é, em parte, explicado pela resposta imune celular alterada.

Os anticorpos IgA também podem estar aumentados em fetos infectados, porém em níveis mais baixos que os anticorpos IgM.<sup>67</sup> As demais classes de imunoglobulinas são produzidas em quantidades mínimas.

A lenta maturação da resposta imune na rubéola congênita pode também ser observada por meio da persistência de IgG1 de baixa avididade por 7 a 15 meses.<sup>68</sup>

A imunidade celular é gravemente acometida quando a infecção por vírus da rubéola ocorre no início da gravidez, até 4 meses.<sup>32,69</sup> A resposta linfoproliferativa diminuída é observada em mais da metade das crianças com menos de 3 anos de idade congenitamente infectadas, podendo ser útil nos casos em que as anormalidades, tais como a surdez sensorineural, são detectadas tardiamente, quando somente a sorologia não possibilita o diagnóstico preciso. Uma resposta linfoproliferativa negativa com a sorologia positiva sugere infecção congênita.<sup>29</sup>

O diagnóstico laboratorial da rubéola intrauterina pode ser feito precocemente durante a gestação em materiais obtidos por técnicas como: biópsia do viló coriônico e amniocentese para a demonstração do vírus e cordocentese, tanto para testes virológicos como também para sorológicos.<sup>70,71</sup> A identificação do vírus ou de seus antígenos nesses materiais pode ser feita pelas técnicas como a imuno-histoquímica, que fornece resultados muito mais sensíveis e rápidos do que a tradicional cultura. Entretanto, a demonstração do material genômico do vírus pelas técnicas de amplificação do ácido nucleico, principalmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) constitui, atualmente, método de escolha pela praticidade e elevada sensibilidade.<sup>31,71</sup>

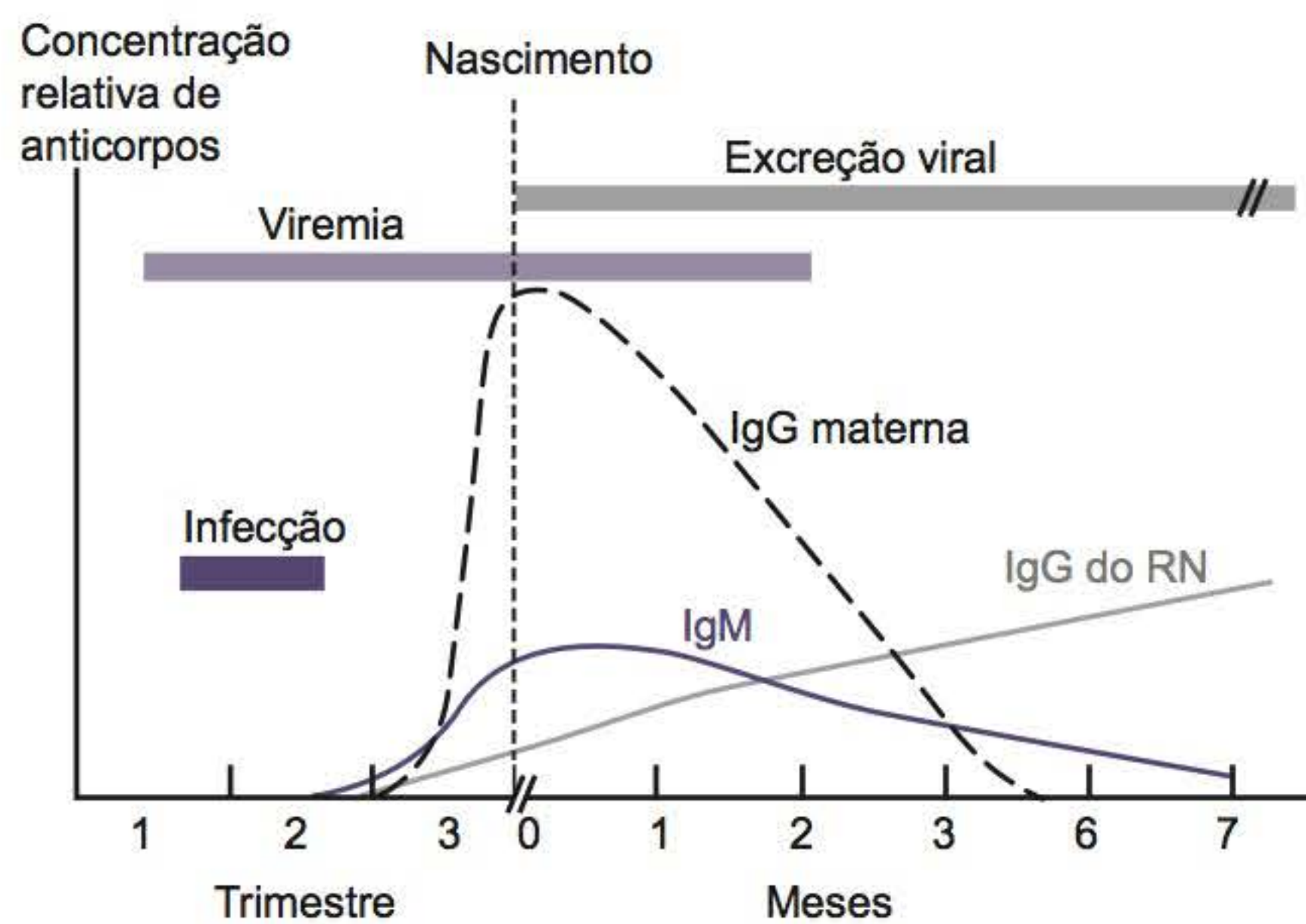
A biópsia de viló coriônico pode ser feita a partir do final do primeiro trimestre e a amniocentese entre 15 e 20 semanas de gravidez. Contudo, o emprego dessas técnicas é limitado em razão do risco de perda fetal, de 1 a 5%. A cordocentese é, atualmente, muito utilizada no diagnóstico intrauterino da rubéola congênita. O sangue fetal, neste caso, deve ser coletado após 22 a 24 semanas de gravidez, e pode ser empregado tanto para o diagnóstico virológico como também para a sorologia.<sup>26</sup>

Portanto, a sorologia é, na prática, o recurso laboratorial mais importante no diagnóstico da rubéola congênita e se baseia, entre outros, no diagnóstico da infecção materna, na detecção de IgM total e específica no feto ou no recém-nascido, na dosagem de IgG até 6 meses a 1 ano após o nascimento e na determinação da avididade de IgG.

Atualmente, o Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde, classifica como caso confirmado de SRC associada ao vírus selvagem da rubéola “recém-nascido ou criança menor de 1 ano que apresente manifestações clínicas de SRC e resultados laboratoriais com anticorpos IgM reagente para rubéola ou IgG reagente e persiste para rubéola depois de 6 meses de vida e com a identificação do vírus selvagem”.<sup>17</sup>

Assim, testes moleculares ganham espaço a cada dia no diagnóstico de rubéola adquirida, mas principalmente na identificação e na confirmação de rubéola congênita. Para facilitar a interpretação, o perfil sorológico da rubéola congênita pode ser observado na Figura 11.2.





**Figura 11.2** Perfil sorológico relativo na rubéola congênita consequente à infecção materna no início da gravidez.

## ► Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é essencialmente sorológico e visa principalmente à detecção de: rubéola congênita e pós-natal, controle de vacinação, determinação da imunidade e estudos soropidemiológicos.

Os testes sorológicos baseiam-se:

- No efeito dos anticorpos sobre a função biológica específica do vírus, como as técnicas de neutralização (NT) e de inibição de hemaglutinação (IHA)
- Na reação entre o anticorpo e qualquer componente antigênico relevante do vírus da rubéola como as técnicas imunoenzimáticas, imunofluorescência, aglutinação de partículas de látex e outros.

### ▪ Técnica de neutralização e teste de inibição de hemaglutinação

A técnica de neutralização (NT) determina a capacidade do anticorpo presente no soro do paciente de neutralizar a infecciosidade viral e a de inibir a atividade hemaglutinante do vírus da rubéola.

A NT poderia ser considerada como o *gold standard* da sorologia para a rubéola, pois é a que melhor se correlaciona com a proteção. Entretanto, em razão da necessidade de culturas celulares para a sua realização, o seu uso na rotina diagnóstica é limitado.

O teste de inibição de hemaglutinação (IHA) foi o primeiro ensaio para detecção de anticorpos antirrubéola disponível para a maioria dos laboratórios de rotina diagnóstica, sendo considerado na prática como teste de referência para avaliação de novos testes.<sup>72,73</sup> O antígeno hemaglutinante é constituído de vírus da rubéola, obtido por meio da cultura de cepa bem caracterizada em linhagens celulares como BHK-21 ou Vero, extraído com solução alcalina, seguido de purificação para remoção de restos celulares e tratamento com tween 80 e éter.<sup>66,74</sup> O teste de IHA requer tratamento do soro para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinina viral (NSI). Estes inibidores, associados à fração beta lipoproteína do soro, podem levar a resultados falso-positivos ou desvio dos títulos para níveis mais altos, pois o seu efeito sobre a reação é semelhante ao produzido pelos anticorpos.

A remoção de inibidores inespecíficos tem sido feita por meio de:

- Caolim
- Mistura heparina-cloreto de manganês
- Sulfato de dextrana-cloreto de cálcio, a partir do soro não inativado, e as hemácias indicadoras mais empregadas no teste têm sido as de pinto, pombo, ganso e hemácias humanas do grupo "O" tripsinizadas.<sup>75</sup>

Em 1983, o teste foi avaliado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que indicou o uso da solução de heparina-cloreto de manganês para a remoção dos NSI e hemácias de pinto de 1 a 3 dias, como indicadora da reação e a técnica, assim padronizada, foi considerada como teste de referência da OMS.<sup>72</sup> A sensibilidade do IHA nessas condições foi de 95 a 100%, especificidade superior a 98% e a reprodutibilidade interteste de 97 a 100%.<sup>72</sup> Entretanto, o uso das hemácias humanas foi adotado por muitos laboratórios em virtude da facilidade em obtê-las, apesar de os resultados serem apenas discretamente mais sensíveis e menos específicos do que os obtidos com hemácias de pinto.<sup>75</sup>

A expressão em unidades internacionais (UI) constitui a melhor maneira de padronização de resultados entre diferentes metodologias e laboratórios. O valor de *cut-off* ou limiar de reatividade para anticorpos antirrubéola mais aceito é de 10 UI/mL.<sup>62,76</sup>

Apesar do grande emprego nas últimas décadas, atualmente o IHA não é mais utilizado na maioria dos laboratórios de diagnóstico, tendo sido substituído por métodos mais simples, práticos, automatizáveis e de elevada sensibilidade, como o ELISA.

### ▪ Teste de aglutinação passiva

É um teste simples e rápido, porém pouco empregado em razão da disponibilidade de testes mais práticos, como o ELISA. A positividade desse teste é lenta, ocorrendo entre 10 e 48 dias após o início da doença, e torna-se comparável ao IHA somente depois de 6 meses.<sup>77,78</sup> Essa característica do teste de aglutinação passiva (HAP) pode ser útil no estabelecimento da infecção recente quando for capaz de detectar uma soroconversão em situações nas quais o teste de IHA já tenha alcançado valores máximos e estáveis.<sup>78,79</sup>

### ▪ Teste de imunofluorescência indireta

A imunofluorescência torna possível definir as classes de imunoglobulinas antirrubéola e apresenta concordância com o IHA de 98%.<sup>79,80</sup> Entretanto, soros próximos ao *cut-off* podem apresentar discordâncias significativas. No teste de imunofluorescência indireta (IFI)-IgM a remoção do fator reumatoide e de IgG em excesso deve ser feita para prevenir resultados falso-positivos ou falso-negativos.<sup>81</sup>

### ▪ Testes imunoenzimáticos

*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) é, atualmente, a técnica mais empregada no diagnóstico sorológico da rubéola. A maioria dos laboratórios utiliza testes de procedência comercial, que são oferecidos sob a forma de *kits*, tanto para a execução manual como parcial, ou totalmente automatizados. Dentre as variações metodológicas do ELISA, o método indireto e de captura de IgM são os mais empregados, respectivamente para a detecção de anticorpos IgG e IgM. No teste qualitativo, um limiar de reatividade (*cut-off*) de 10 unidades internacionais/mL (UI/mL) define os resultados como



sendo positivos ou negativos, respectivamente, para amostras acima ou abaixo desse valor.<sup>76,82</sup> Esse limiar corresponde, geralmente, ao ponto de intersecção da curva bimodal obtida pela aplicação do teste em população sabidamente positiva e em população negativa, determinadas por um teste de referência. Em geral, margem de segurança de 10% em torno do valor do *cut-off* é estabelecida para que os valores de absorbância nela contidos sejam considerados como resultado inconclusivo. No teste quantitativo, o título do soro é calculado em relação aos soros de referência fornecidos pelo fabricante, que são soros previamente aferidos por um padrão primário e expressos em UI/ml.

ELISA com antígeno viral total detecta potencialmente anticorpos contra todos os antígenos fixados na fase sólida, não distinguindo os envolvidos na proteção dos demais. Resultados positivos no ELISA com antígeno total e negativos em IHA observados em algumas amostras podem ser decorrentes da diferença na sensibilidade destes métodos ou ainda em razão da presença, nestas amostras, de anticorpos que não têm a capacidade de neutralizar a função biológica do vírus da rubéola, mas que reagem com outros componentes antigênicos.<sup>40,41</sup> Neste caso, o indivíduo, apesar de soropositivo, pode ser suscetível a reinfecção. Por esse motivo, há um esforço em se produzirem testes imunológicos que detectem especificamente anticorpos protetores por meio da seleção de antígenos.

Antígenos virais constituídos de complexo E1-E2 purificados por cromatografia de afinidade têm demonstrado alta atividade hemaglutinante e, por isso, são úteis para os testes imunoenzimáticos.<sup>83</sup> Antígenos de especificidade definida, como os recombinantes e peptídios sintéticos (PS), têm sido ensaiados por diversos grupos. Estudos realizados por Mitchell *et al.*<sup>40</sup> demonstraram que alguns PS como o SP1 têm demonstrado no ELISA resultados comparáveis aos obtidos por NT, IHA e ELISA com antígeno total, na rubéola pós-natal. Entretanto, na rubéola congênita, os níveis de anticorpos detectados por esse antígeno foram inferiores aos detectados por antígeno de vírus total, provavelmente porque o PS representava o epitopo do E1 cuja resposta pode ser reduzida na rubéola congênita.<sup>40,81</sup> A avaliação desse PS no ELISA demonstrou uma sensibilidade de 95% e especificidade de 100% em relação ao ELISA com antígeno viral. A associação de PS com outro peptídio, o SP-E2 (sequência 10 a 36 do E2), aumenta a sensibilidade para 100%, porém a especificidade diminui para 97%.<sup>61</sup> O emprego de PS associados estrategicamente, provavelmente, constitui uma das alternativas para se ter a máxima eficiência diagnóstica no ELISA.

Atualmente, *kits* de detecção de anticorpos antirrubéola são realizados por meio de equipamentos automatizados de avançada tecnologia e têm fornecido resultados muito sensíveis, específicos e reprodutíveis. Os equipamentos disponíveis no mercado tanto no sistema aberto (que possibilita operar *kits* reagentes de diferentes procedências) como no fechado (que opera apenas *kits* produzidos especificamente para aquele equipamento) empregam novos suportes sólidos, potentes meios de geração de sinal e controles rigorosos do teste e da operação.

O ELISA para a detecção de IgM antirrubéola é o teste mais importante no diagnóstico da infecção primária materna e da rubéola congênita. A técnica de captura de IgM é a mais empregada por não apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas, respectivamente, em amostras que apresentam o fator reumatoide e naquelas com excesso de IgG antirrubéola. No ELISA indireto, a presença do fator reumatoide da classe

M em amostras positivas para IgG pode provocar resultado falso-positivo para IgM e constituir um problema importante, pois a prevalência desse fator é particularmente mais alta na rubéola congênita do que as infecções congênicas causadas por outros vírus.<sup>57</sup> Nesta técnica, assim como na reação de imuno-fluorescência indireta, IgG antirrubéola do soro do paciente, ao se ligar ao antígeno imobilizado na fase sólida, torna-se alvo do fator reumatoide. Este é detectado pelo conjugado anti-IgM, produzindo assim resultado falso-positivo.<sup>84-86</sup> A eliminação do fator reumatoide pode ser feita tratando-se a amostra com soro de carneiro contra cadeia gama humana, que, além de eliminar o fator reumatoide, remove também a IgG, que, sendo específica para o RV, compete com IgM pelo mesmo antígeno imobilizado na fase sólida.<sup>85,86</sup> Essa competição é especialmente importante na detecção de IgM para o diagnóstico de infecção congênita, em que altas concentrações de IgG antirrubéola, transferidas passivamente da mãe, “ocultam” os anticorpos IgM produzidos pelo recém-nascido. O teste de captura de IgM elimina essa etapa do tratamento do soro; porém, o conjugado antivírus da rubéola utilizado na revelação do IgM do paciente deve ser a fração F(ab')<sub>2</sub>.

As outras fontes mais comuns de erro nas técnicas de ELISA-M são:

- Achados, no soro, de anticorpos da classe M contra componentes da célula utilizada na cultura do vírus, podendo resultar em falso-positivo.<sup>86</sup> Essa interferência pode ser detectada incluindo-se no teste o controle do antígeno constituído apenas de células não infectadas
- Reações falso-positivas podem ocorrer principalmente em amostras de pacientes com mononucleose infecciosa na presença de anticorpos heterófilos e anticorpos anti-EBV-IgM, pacientes infectados por parvovírus B19; vírus Cocksackie B<sup>36,87,88</sup>
- A remoção de IgG pela proteína A de estafilococo nos testes para a detecção de IgA e IgM é limitada em razão da falha na ligação com IgG<sup>389</sup>
- Os testes anti-IgM ocasionalmente podem, ainda, resultar em falso-positivos sem uma causa aparente, por variáveis presentes mas que não são controladas nem detectadas na reação.<sup>64,90</sup>

### Avidez de anticorpos IgG

A distinção entre a infecção primária subclínica e a reinfecção é de grande importância em gestantes.<sup>88,90</sup> Essa distinção nem sempre é fácil, pois os anticorpos IgM específicos detectados em infecções primárias podem também ocorrer em reinfecções, ainda que em níveis baixos.<sup>63,90,91</sup> Aliada à dificuldade na interpretação de resultados de IgM, devido a diversos fatores interferentes na determinação deste anticorpo, a sor conversão só é possível de ser detectada nesses casos quando a primeira amostra for coletada no início da infecção, tão cedo quanto possível, até poucos dias após o aparecimento dos sintomas.

O teste de avidéz constitui um importante recurso para o diagnóstico da infecção primária pelo VR,<sup>48,49,63,88,90,91</sup> da SRC<sup>64,68</sup> e das reinfecções. No início da infecção primária, os anticorpos IgG têm baixa avidéz, a qual vai aumentando lentamente no decorrer de semanas a meses. Assim, os anticorpos IgG resultantes de infecções antigas e de reinfecções apresentam alta avidéz.<sup>62,63</sup> A detecção dessa diferença constitui a base do teste de avidéz do IgG.

Assim, na prática, a avidéz é determinada mediante teste ELISA no qual se faz a dissociação da ligação prévia entre IgG



de baixa avidéz e o antígeno fixado na fase sólida, por meio de lavagens da placa em solução contendo ureia.<sup>49,91</sup> O ensaio é feito com uma única diluição do soro na presença ou não da ureia, e a relação entre as absorbâncias fornece o índice de avidéz. Quanto maior a avidéz, maior será essa relação, e quanto menor a avidéz, menor será este valor.<sup>64,92</sup> Em geral, IgG de baixa avidéz é observada até 3 a 5 meses após a infecção primária.<sup>93</sup>

O comportamento de IgG de baixa avidéz na SRC é diferente das infecções adquiridas, em que permanece por um tempo bem maior, podendo ser detectado na maioria das crianças até 15 meses e em 40% delas até 3 anos,<sup>68</sup> um período bem superior que a positividade de IgM.<sup>64</sup> Portanto, torna-se difícil discriminar, em crianças maiores, a rubéola congênita da rubéola adquirida após o nascimento, pois em ambas as situações a avidéz será baixa. Além disso, em recém-nascidos com rubéola congênita, nascidos de mães que tiveram a rubéola no início da gravidez, a IgG materna de alta avidéz, transferida em grande quantidade ao recém-nascido, pode interferir nestes testes. Assim, a diminuição da avidéz em amostras seriadas após o nascimento sugere a rubéola congênita.<sup>94</sup> Em indivíduos vacinados, a avidéz dos anticorpos IgG também aumenta lentamente, alcançando o máximo no período de 6 meses a 1 ano.<sup>91</sup> Testes de avidéz estão disponíveis comercialmente e podem ser realizados por aparelhos totalmente automatizados.<sup>92</sup>

Os principais dados laboratoriais no diagnóstico da rubéola pós-natal e da rubéola congênita podem ser resumidos como se verifica no Quadro 11.4.

## ■ Métodos moleculares

A PCR aplicada ao VR torna possível a detecção da infecção congênita, muito precocemente, no feto, no produto de aborto ou no recém-nascido, mesmo na presença de altos títulos de anticorpos maternos. A *real-time PCR* (RT-PCR) pode ser feita a partir do RNA do vírus da rubéola, seguida de transcrição reversa para obtenção do cDNA e posterior amplificação utilizando *primers* da região E1. Uma nova amplificação

do segmento menor do produto amplificado previamente, utilizando-se *primers* internos, constitui a *nested-PCR* (nPCR), que apresenta elevada sensibilidade.<sup>95-97</sup> Este método possibilita diagnosticar a infecção muito precocemente, tanto no soro como no fluido oral, nos primeiros 2 dias após o início da doença, quando os testes de detecção da IgM antirrubéola estão ainda negativos.<sup>98</sup> Para o diagnóstico intrauterino da rubéola congênita, a RT-PCR pode ser aplicada ao líquido amniótico com sensibilidade de 83 a 95% e especificidade de 100%, segundo alguns autores.<sup>99</sup>

Recentemente, a PCR em tempo real tem sido muito empregada na detecção e na quantificação do RNA do vírus da rubéola em vários materiais clínicos como soro, *swab* de garganta, fluido oral e em lentes para casos de crianças com manifestações oculares decorrentes da SRC. Essa técnica, disponível comercialmente, é rápida, altamente sensível, específica e de fácil realização. Resultados quantitativos mediante o uso de padrões possibilitam monitorar a excreção viral em pacientes com SRC.<sup>100</sup>

PCR para detecção de vários agentes em um único teste, a Multiplex PCR, tem sido testada por alguns autores com resultados promissores para os vírus da rubéola e sarampo em diferentes amostras clínicas.<sup>101</sup>

Para o diagnóstico da infecção intrauterina do feto por vírus da rubéola, o vilo coriônico e o líquido amniótico devem ser coletados decorridas pelo menos 4 semanas após a infecção materna, e o sangue fetal coletado após 20 semanas de gestação.<sup>97</sup> Contudo, a interpretação dos resultados desses métodos moleculares exige muita cautela, sobretudo quando o material pesquisado é o vilo coriônico ou o líquido amniótico, pois a presença do material genômico do vírus da rubéola não implica necessariamente feto infectado congenitamente. A PCR demonstra apenas a persistência da infecção nesses materiais, identificando, assim, fetos com alto risco de infecção congênita.<sup>97</sup> Entretanto, é inegável o aumento da sensibilidade ao se utilizar esta técnica. Em material de necropsia, a nPCR demonstrou sensibilidade de 75%, percentual bem superior aos 20% obtidos pelo método convencional de isolamento do vírus.<sup>95</sup>

A PCR pode também ser realizada em cultura de células inoculadas previamente com o material clínico para se obterem resultados mais precocemente. A amplificação do RNA do vírus da rubéola é também utilizada para o sequenciamento e a genotipagem de diferentes cepas virais, úteis nos estudos epidemiológicos.

## ■ Testes laboratoriais para inquéritos/vigilância sobre a epidemiologia da rubéola

Para a realização de estudos epidemiológicos sobre rubéola e sarampo em regiões onde a obtenção e o transporte do soro sob refrigeração é difícil, a utilização do sangue coletado em papel de filtro e saliva coletada em coletores especiais têm sido sugeridas. Resultados de avaliação realizada pela Organização Mundial da Saúde mostraram que ambos os materiais apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes às obtidas no soro, tanto para a detecção de IgM específica como também para a detecção do RNA viral.<sup>102</sup>

## ► Referências bibliográficas

- Cooper LZ. The history and medical consequences of rubella. Rev Infect Dis 1985; 7(Suppl.1): 2-10.

**Quadro 11.4 • Resumo dos principais achados laboratoriais no diagnóstico da rubéola e da síndrome da rubéola congênita.**

Infecção primária	IgM positiva a partir de 1 a 3 dias após o início da doença até 1 a 2 meses por IHA ou 2 a 6 meses por ELISA IHA a partir de 1 a 3 dias da doença e presente indefinidamente IgG positiva a partir de 3 a 4 dias da doença e presente indefinidamente IgG de baixa avidéz até 3 a 5 meses RNA do vírus da rubéola positivo
Reinfecção	Sorologia positiva anterior à reinfecção IgG positiva com elevação de 4 vezes ou mais no título da 2ª amostra IgM às vezes presente IgG de alta avidéz presente
Rubéola congênita	IgM positiva IgG materna presente até cerca de 6 meses IgG de baixa avidéz detectável entre 2 meses a 1 ano IgG positiva por mais de 6 meses RNA do vírus da rubéola positivo
Imunes e vacinados	IgG positiva IgM negativa IgG de alta avidéz presente

IgG = imunoglobulina G.



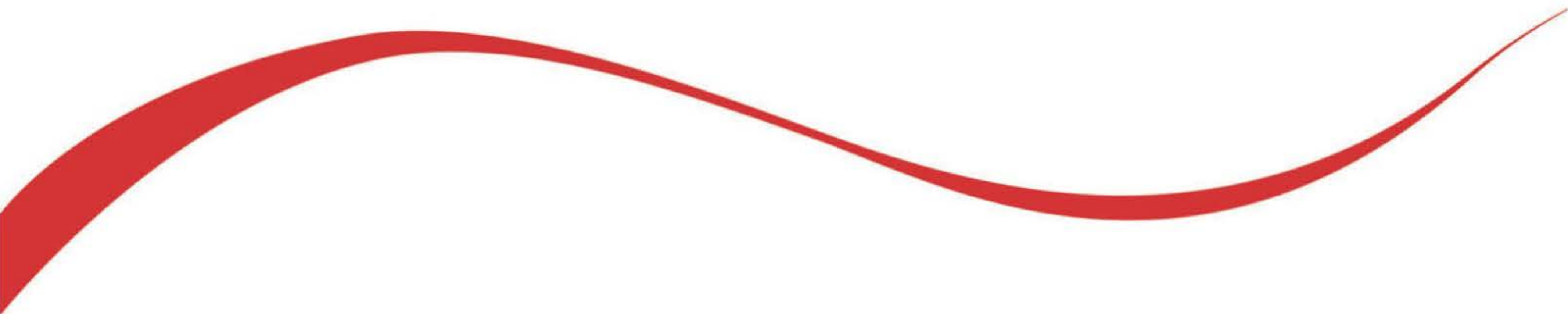
2. Webster WS. Teratogen update: congenital rubella. *Teratology* 1998; 58:13-23.
3. Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. Rubéola e Síndrome da rubéola congênita – Normas e Instruções. In: Manual de Vigilância Epidemiológica, CVE, São Paulo, 1992; p. 16-25.
4. Assaad F, Ljungars-Esteves K. Rubella World Impact. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.): 28-36.
5. Schatzmayr HG. Aspects of rubella in Brazil. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.): 53-55.
6. Diniz EMA, Ramos JLA, Vaz FAC. Rubéola congênita. In: Diniz EMA, Vaz FAC. Infecções congênitas e perinatais. São Paulo: Atheneu, 1991; p. 100-116.
7. Cooper LZ, Preblud SR, Alford Jr CA. Rubella. In: Remington, JS, Klein JO (eds). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: Saunders, 1995; p. 268-311.
8. Miller E, Cradock-Watson JE, Pollock TM. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet* 1982; 781-784.
9. Katz SL. Rubella (German Measles). In: Wyngaarden JB, Smith LH. *Cecil textbook of medicine*, 18. ed., New York: Saunders, 1988; p. 1776-1778.
10. Knox EG. Theoretical aspects of rubella vaccination strategies. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.): 194-197.
11. World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record*, 1991; 66: 217-224.
12. Ueda K, Tokugawa K, Kusuhara K. Perinatal viral infections. *Early human Development* 1992; 29: 131-136.
13. Banatvala JE, Best JM. Persistence of rubella antibodies after vaccination: detection after experimental challenge. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.1): 86-90.
14. Halsey NA, Abramson JS, Chesney PJ *et al.* Age for routine administration of the second dose of measles-mumps-rubella vaccine. *Pediatrics* 1998; 101: 129-133.
15. CDC. Rubella and congenital rubella syndrome – United States 1994. *MMWR* 1994; 43: 391-400.
16. CDC. Rubella and congenital rubella syndrome – United States, 1994-1997. *MMWR*. 1997; 46: 350-354.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria em Vigilância em Saúde. Manual técnico-operacional – Campanha Nacional de Vacinação para Eliminação da Rubéola no Brasil, Brasília (DF), 2008.
18. Perkins FT. Licensed vaccines. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.): 73-76.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-vacinação. Brasília (DF), 2007.
20. Ou D, Mitchell LA, Décarie D *et al.* Characterization of an overlapping CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-Cell epitope on rubella capsid protein. *Virology* 1997; 235: 286-292.
21. Goh L, Lim FS, Han, HH *et al.* Safety and immunogenicity of early vaccination with two doses of tetravalent measles-mumps-rubella-varicella (MMRV) vaccine in health children from 9 month of age. *Infection* 2007; 35: 326-33.
22. Schuster, V, Otto W, Maurer L *et al.* Immunogenicity and safety assessments after one and two doses of a refrigerator-stable tetravalent measles-mumps-rubella-varicella vaccine in health children during the second year of life. *Pediatr Infect Dis* 2008; 27: 724-730.
23. Dhillon S, Curran MP. Live attenuated measles, mumps, rubella, and varicella zoster vaccine (Priorix-Tetra). *Paediatr Drugs* 2008; 10(5): 337-347.
24. Tobin JO, Sheppard S, Smithells RW *et al.* Rubella in the United Kingdom, 1970-1983. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.1): 47-52.
25. Litwin CM, Hill HR. Serologic and DNA-based testing for congenital and perinatal infections. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 1166-75.
26. Isada NB, Paar DP, Grossman JH *et al.* TORCH infections. Diagnosis in the molecular age. *J Reprod Med* 1992; 37: 449-507.
27. Mauracher CA, Mitchell L, Tingle AL. Selective tolerance to E1 protein of rubella virus in congenital rubella syndrome. *J Immunol* 1993; 151: 2041-2049.
28. Cooper LZ, Alford CA. Rubella. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ. *Infectious diseases of fetus and newborn infant*. Elsevier Saunders, EUA, 2006; p. 893-926.
29. O'Shea S, Best J, Banatvala JE. A lymphocyte transformation assay for the diagnosis of congenital rubella. *J Virol Methods* 1992; 37: 139-148.
30. Chantler JK, Lund KD, Miki NPH *et al.* Characterization of rubella virus strain differences associated with attenuation. *Intervirology* 1993; 36: 225-236.
31. Chaye HH, Chong P, Tripet B *et al.* Localization of the neutralizing and hemagglutinin epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *Virology* 1992; 189: 483-492.
32. Chaye HH, Mauracher CA, Tingle AJ *et al.* Cellular and humoral immune response to rubella virus structural proteins E1, E2 and C. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2323-2329.
33. Seto NO, Gillan S. Expression and characterization of a soluble rubella virus E1 envelope protein. *J Med Virol* 1994; 44: 192-199.
34. Pettersson RF, Oker-Blom C, Kalkkinen N *et al.* Molecular and antigenic characteristics and synthesis of rubella virus structural proteins. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.1): 140-149.
35. Bellini WJ, Icenogle JP. Measles and Rubella Virus. In: Murray PR; Baron EJ, Jorgensen JH *et al.* *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. ASM Press. Washington DC, 2003; p. 1389-1403.
36. Chaye HH, Ou D, Chong P *et al.* Human T-and B-cell epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *J Clin Immunol* 1993; 13:93-100.
37. Dorsett PH, Miller DC, Green KY *et al.* Structure and function of the rubella virus proteins. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.1): 150-156.
38. Pedneault L, Zrein M, Robillard L *et al.* Comparison of novel synthetic peptide-based Detect-Rubella enzyme immunoassays with Enzygnost and IMx for detection of rubella-specific immunoglobulin G. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1085-1087.
39. Letschka T, Walder G, Dierich MP *et al.* A synthetic peptide ELISA for the screening of rubella virus neutralizing antibodies in order to ascertain immunity. *J Immunol Methods* 2004; 287: 1-11.
40. Mitchell LA, Zhang T, Ho M *et al.* Characterization of rubella virus-specific antibody responses by using a new synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1992; 30(7): 1841-1847.
41. Zrein M, Joncas JH, Pedneault L *et al.* Comparison of a whole-virus enzyme immunoassay (EIA) with a peptide-based EIA for detecting rubella virus immunoglobulin G antibodies following vaccination. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1521-1524.
42. Wolinsky JS, Sukholutsky E, Moore WT *et al.* An antibody-and synthetic peptide-defined rubella virus E1 glycoprotein neutralization domain. *J Virol* 1993; 67: 961-968.
43. Ho-Terry L, Cohen A. The role of hemagglutination and immunological reactivity of rubella virus. *Arch Virol* 1984; 79: 139-146.
44. Grangeot-Keros L, Enders G. Evaluation of a new immunoassay based on recombinant rubella virus-like particles for detection of immunoglobulin M antibodies to rubella virus. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 398-401.
45. Wen H, Wang Z. Expression and characterization of rubella virus glycoprotein E1 in yeast cell. *Intervirology* 2005; 48: 321-328.
46. Enders G. Serologic test combinations for safe detection of rubella infection. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.1): 113-122.
47. Herrmann K. Available rubella serologic tests. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.): 108-112.
48. Thomas HJ, Morgan-Capner P, Enders G *et al.* Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. *J Virol Methods* 1992; 39: 149-155.
49. Hedman K, Rousseau SA. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J Med Virol* 1989; 27: 288-292.
50. Thomas HJ, Morgan-Capner P. Specific IgG subclass antibody in rubella virus infections. *Epidem Inf* 1988; 100: 443-454.
51. Halonen P, Meurman O, Matikainen MT *et al.* IgA antibody response in acute rubella determined by solid-phase radioimmunoassay. *J Hyg Camb* 1979; 83: 69-75.
52. Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Atualização do Manual de Vigilância Epidemiológica do Sarampo, Rubéola, e Síndrome da Rubéola Congênita. São Paulo, 1996; p. 8-19.
53. Abbott GG, Safford JW, MacDonald RG *et al.* Development of automated immunoassays for immune status screening and serodiagnosis of rubella virus infection. *J Virol Methods* 1990; 27: 227-239.
54. Schwartz S, Reibel S, Lang AB *et al.* Safety and characterization of the response engendered by two combined measles, mumps and rubella vaccines. *Vaccine* 1998; 16: 298-304.
55. Horstmann DM, Schluederberg A, Emmons JE *et al.* Persistence of vaccine-induced immune responses to rubella: comparison with natural infection. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.): 80-85.
56. Lindegren ML, Fehrs LJ, Hadler SC *et al.* Update: Rubella and congenital rubella syndrome, 1980-1990. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 341-348.
57. Perry KR, Brown WG, Parry JV *et al.* Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay. *J Med Virol* 1993; 40: 235-240.
58. Morgan-Capner P, Hambling MH, Coleman TJ *et al.* Detection of rubella-specific IgM in subclinical rubella reinfection in pregnancy. *Lancet* 1985; I: 244-246.
59. Cordoba P, Nates S, Mahony J *et al.* Kinetics of rubella-specific IgM antibody response in postnatal rubella infection. *J Virol Methods* 1991; 34: 37-43.



60. Balfour Jr. HH, Groth KE, Edelman CK. Rubella viraemia and antibody responses after rubella vaccination and reimmunisation. *Lancet* 1981; I: 1078-1080.
61. Cusi MG, Valensin PE, Cellesi C. Possibility of reinfection after immunisation with RA 27/3 live attenuated rubella virus. *Arch Virol* 1993; 129: 337-340.
62. Dimech W, Bettoli A, Eckert D *et al.* Multicenter evaluation of five commercial rubella virus immunoglobulin G kits which report in international units per milliliter. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 633-641.
63. Thomas HIJ, Morgan-Capner P. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidem Inf* 1988; 101: 591-598.
64. Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Cradock-Watson JE *et al.* Slow maturation of IgG1 avidity and persistence of specific IgM in congenital rubella: implications for diagnosis and immunopathology. *J Med Virol* 1993; 41: 196-200.
65. Xanthou M. Neonatal Immunity. In: Stern L, Vert P (eds). *Neonatal medicine*, New York: Masson, 1987; p. 555-586.
66. Murray HGS, Stanton J, Gardner PS. Study of discrepancies in rubella haemagglutinin titrations and a reappraisal of diluents used in the rubella haemagglutination inhibition technique. *J Clin Pathol* 1985; 38: 198-202.
67. Grangeot-Keros L, Pillot J, Daffos F *et al.* Prenatal and postnatal production of IgM and IgA antibodies to rubella virus studied by antibody capture immunoassay. *J Infect Dis* 1988; 158: 138-143.
68. Fitzgerald MG, Pullen GR, Hosking CS. Low affinity antibody to rubella antigen in patients after rubella infection in utero. *Pediatrics* 1988; 81: 812-814.
69. Seth P, Manjunath N, Balaya S. Rubella infection: The Indian Scene. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl.1): 64-67.
70. Grose C, Itani O, Weiner CP. Prenatal diagnosis of fetal infection: advances from amniocentesis to cordocentesis-congenital toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, varicella virus, parvovirus and human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 459-468.
71. Kunakorn M, Petchclai B, Liemsuwan C. Laboratory diagnosis of congenital and maternal rubella infection: a review. *J Med Assoc Thai* 1992; 75(Suppl.1): 282-287.
72. Suggs M, Brès P, Huoang L *et al.* Evaluation of candidate international reference methods for the rubella hemagglutination inhibition test: report of a collaborative study. *PAHO Bull* 1983; 17: 281-291.
73. Weber B. Current developments in the laboratory diagnosis of rubella. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb* 1997; 134: 31-41.
74. Liebhaber, H. Measurement of rubella antibody by hemagglutination inhibition. I-Variables affecting rubella hemagglutination. *J Immunol* 1970; 104: 818-825.
75. Nelson DB, Quirin EP, Inhorn SL. Compatibility of trypsin-modified human erythrocytes in the rubella hemagglutination-inhibition test employing three serum treatment procedures. *Appl. Microbiol* 1974; 27: 767-770.
76. Skendzel LP. Rubella Immunity: defining the level of protective antibody. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 170-173.
77. Birch CJ, Glaun BP, Hunt V *et al.* Comparison of passive haemagglutination and haemagglutination-inhibition techniques for detection of antibodies to rubella virus. *J Clin Pathol* 1979; 32: 128-131.
78. Cremer NE, Hagens SJ, Cossen CK. Specificity of the passive hemagglutination test for antibody to rubella virus and the passive hemagglutination response after vaccination. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 226-227.
79. Deibel R, D'Arcangelis D, Ducharme CP *et al.* Assay of rubella antibody by passive hemagglutination and by a modified indirect immunofluorescence test. *Infection* 1980; 8(Suppl.3): 255-260.
80. Condorelli F, Ziegler T. Dot Immunobinding assay for simultaneous detection of specific immunoglobulin G antibodies to measles virus, mumps virus, and rubella virus. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 717-719.
81. Skaug K, Gaader PI. An indirect immunofluorescent antibody test for determination of rubella virus specific IgM antibodies. *Acta Path Microbiol Scand Sect C* 1978; 86: 33-35.
82. Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. *Lancet* 2004; 363: 1127-1137.
83. Van Someren AP, Machielsens PA, Schielen WJ *et al.* Purification of rubella virus E1-E2 protein complexes by immunoaffinity chromatography. *J Virol Methods* 1997; 63(1-2): 37-46.
84. Bellin E, Safyer S, Braslow C. False positive IgM-rubella enzyme-linked immunoassay in the first trimester pregnant patients. *Ped Infect Dis J* 1990; 9: 671-672.
85. Champsaur H, Fattal-German M, Arranhado R. Sensitivity and specificity of viral immunoglobulin M determination by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 328-332.
86. Salonen EM, Vaheri A, Suni J, Wager O. Rheumatoid factor in acute viral infections: interference with determinations of IgM, IgG, and IgA antibodies in an enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 1980; 142: 250-255.
87. Kurtz JB, Anderson MJ. Cross-reaction in rubella and parvovirus specific IgM tests. *Lancet* 1985; II: 1356.
88. Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Hesketh L. Persistent rubella-specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection. *J Med Virol* 1992; 36: 188-192.
89. Zhang T, Mauracher CA, Mitchel LA *et al.* Detection of rubella virus-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies by immunoblot assays. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 824-830.
90. Morgan-Capner P. False positive tests for rubella-specific IgM. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 415-416.
91. Hedman K, Hietala J, Tiilikainen A *et al.* Maturation of immunoglobulin G avidity after rubella vaccination studied by an enzyme-linked immunosorbent assay (avidity-ELISA) and by haemolysis typing. *J Med Virol* 1989; 27: 293-298.
92. Vauloup-Fellous C, Ursulet-Diser J, Grangeot-Keros L. Development of a rapid and convenient method for determination of rubella virus-specific immunoglobulin G avidity. *Clin Vac Immunol* 2007; 14: 1416-1419.
93. Condorelli F, Stivala A, Gallo R *et al.* Improvement in establishing the period of rubella virus primary infection using a mild protein denaturant. *J Virol Methods* 1997; 66: 109-112.
94. Herne V, Hedman K, Reedik P. Immunoglobulin G avidity in the serodiagnosis of congenital rubella syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 763-76.
95. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A *et al.* Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 708-713.
96. Revello MG, Sarasini A, Baldanti F *et al.* Use of reverse-transcription polymerase chain reaction for detection of rubella virus RNA in cell cultures inoculated with clinical samples. *New Microbiol* 1997; 20(3): 197-206.
97. Tanemura M, Suzumori K, Yagami Y *et al.* Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: a study of 34 cases diagnosed in fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(2): 578-582.
98. Abernathy E, Cabezas C, Sun H *et al.* Confirmation of rubella within 4 days of rash onset: Comparison of rubella virus RNA detection in oral fluid with immunoglobulin M detection in serum or oral fluid. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 182-188.
99. Macé M, Cointe D, Six C *et al.* Diagnostic Value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4818-4820.
100. Rajasundari TA, Sundarensan P, Vijayalakshmi P *et al.* Laboratory confirmation of congenital rubella syndrome in infants: An eye hospital based investigation. *J Med Virol* 2008; 80: 536-546.
101. Hubschen JM, Kremer Jr, De Landtsheer S *et al.* A Multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. *J Virol Methods* 2008; 149: 246-50.
102. CDC. Center for Diseases Controls Recommendation from na Ad Hoc Meeting of the WHO Measles and Rubella Laboratory Network (LaNet) on Use of Alternative Diagnostic Samples for Measles and Rubella Surveillance. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5724a3.htm>. Acesso em 13-8-2009.



## Seção 3 | Bactérias





- Capítulo 12 | Enterococcias, 157
- Capítulo 13 | Estafilococcias, 170
- Capítulo 14 | Streptococcias, 183
- Capítulo 15 | Infecções por Clamídias e Chlamydófilas, 194
- Capítulo 16 | Infecção por Micoplasmas, 206
- Capítulo 17 | Leptospirose Humana, 218
- Capítulo 18 | Meningites Bacterianas Agudas, 227
- Capítulo 19 | Sífilis, 234
- Capítulo 20 | Tuberculose, 242



## Capítulo 12

---

# Enterococcias

*Ivani Lúcia Leme*

- Introdução, 158
- Microbiologia, 158
- Significado clínico e epidemiologia, 162
- Interpretação do diagnóstico laboratorial, 166
- Considerações finais, 166
- Bibliografia, 166



## ► Introdução

Os enterococos são habitantes naturais do trato gastrointestinal e genital de humanos e animais de sangue quente. Em 1899, Thiercelin os descreveu pela primeira vez como bactérias gram-positivas de origem intestinal, com formato esférico em arranjos de diplococos (Figura 12.1). Foram considerados como simples indicadores de contaminação fecal da água e de alimentos, com alguns relatos de bacteriemia e endocardite infecciosa, síndromes diarreicas em recém-nascidos.

Referidos por longo tempo como *estreptococos de origem fecal*, mais tarde foram classificados como *Streptococcus grupo D*, com base na sorologia e na alta resistência a agentes químicos e físicos. A partir de 1984, com a introdução de técnicas moleculares no estudo do DNA, foram realizadas alterações taxonômicas no gênero *Streptococcus* (família Streptococcaceae), que foi dividido em três novos gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*.

A partir das características fenotípicas e arranjos celulares, as espécies *S. faecalis* e *S. faecium* do gênero *Streptococcus* foram transferidas para o novo gênero *Enterococcus*. Utilizando informações genéticas, imunológicas e em seus polissacarídeos capsulares foram identificados diversos sorotipos específicos de *E. faecalis*.

Atualmente, os enterococos são reconhecidos como importantes patógenos humanos e responsáveis por infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar, com cepas resistentes a antibióticos que sobrevivem em ambientes diversos, salinos ou em temperaturas extremas.

Há relatos clínicos de infecções causadas por enterococos relacionados com a colonização de corpos estranhos ao organismo – principalmente próteses – comprometendo articulações artificiais, cateteres intravasculares implantados, sistemas valvulares internos e externos para drenagem de líquido cefalorraquidiano (*shunts*), lentes intraoculares, endopróteses para vascularização cardíaca (*stents*), coração e válvulas artificiais com prevalência de 10% nas endocardites tardias. Também são responsáveis por infecções endodônticas e resposta inflamatória perirradicular em implantes dentários.

Os enterococos podem adquirir novos determinantes de resistência a agentes antimicrobianos por meio de conjugação entre espécies ou até gêneros diferentes, o que pode resultar em difusão de genes de resistência a antimicrobianos como parte de transpó-

sons conjugativos, ou ainda, por meio de plasmídios responsáveis por feromônios. As capacidades adquiridas tornam os enterococos organismos bem adaptados, facilitando a sobrevivência de amostras multirresistentes em ambientes inóspitos (extremos de pH e temperatura, NaCl a 6,5%). A transmissão potencial de pessoa a pessoa também contribui para sua difusão.

A combinação dos atributos adquiridos por algumas espécies do gênero *Enterococcus* sugere que essas bactérias persistirão como graves agentes patogênicos nos próximos anos, tornando-se um desafio terapêutico devido à sua resistência a inúmeras substâncias antimicrobianas, inclusive agentes ativos contra parede celular, todos os aminoglicosídeos disponíveis, penicilina, ampicilina e vancomicina.

## ► Microbiologia

Atualmente a linhagem completa dos enterococos é descrita como: Organismo celular Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales, Família Enterococcaceae, Gênero *Enterococcus*.

Os enterococos são células esféricas ou ovóides, 0,6 a 2,0 × 0,6 a 2,5 µm, ocorrendo em pares ou cadeias curtas em meio líquido. Podem se apresentar em formas cocobacilares quando o crescimento ocorre em ágar. Crescimento em caldo tioglicolato mostra formas ovaladas e em cadeias na coloração de gram. Não formam endosporos. São organismos gram-positivos e podem ser móveis (raros flagelos). Há ausência de cápsula, porém algumas espécies de enterococos apresentam um polissacarídeo capsular composto de uma molécula similar ao ácido glicérol teicoico contendo unidades repetidas de 6-α-D-glicose-1-2-glicérol-3-PO<sub>4</sub>, substituídas no carbono 2 por um α-2,1, unido na molécula de glicose. São anaeróbios facultativos, químio-organotróficos com metabolismo homofermentativo; fermentam diversos carboidratos com produção principalmente de L(+)-ácido láctico, mas sem produção de gás, com pH final variando entre 4,2 e 4,6. Têm necessidades nutricionais complexas. São catalase-negativos e crescem geralmente de 10 a 45°C (temperatura ótima de crescimento, 37°C) em pH 9,6, com 6,5% de NaCl e na presença de sais biliares a 40% (meio de bile-esculina). Raramente reduzem nitrato; geralmente fermentam lactose.

A maioria das amostras produz antígenos contra o ácido glicérol-teicoico associado à parede celular, o que os identifica com o grupo D de antígenos estreptocócicos. Na classificação sorológica de Lancefield são grupo D. Cepas de origem suína e aviária (*E. cecorum* e *E. avium*) podem apresentar perda do antígeno do grupo D e serem mais sensíveis ao NaCl que outros enterococos (cepa padrão STR 345 – NCIMB 13013).

O gênero *Enterococcus* é composto atualmente por 40 espécies, das quais algumas apresentam características fenotípicas úteis na sua identificação, como pigmentos e motilidade. O *E. sulfureus*, uma espécie isolada de plantas, assim como o *E. casseliflavus*, o *E. gilvus*, *E. pallens*, *E. mundtii*, produz pigmento amarelo. Apenas duas espécies têm motilidade: *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

O *E. saccharolyticus*, conhecido anteriormente como *Streptococcus saccharolyticus*, é uma das espécies introduzidas no novo gênero *Enterococcus*. Posteriormente, com base nos resultados de sequenciamento de rRNA 16S, o *Enterococcus solitarius* mostrou ser mais próximo do *Tetragenococcus halophilus* e passou a ser denominado *T. solitarius*, em relação às outras espécies do gênero *Enterococcus*.

A maioria das espécies de enterococos hidrolisa pirrolidôn timerolida (PYR), com exceção das espécies *E. cecorum*, *E.*

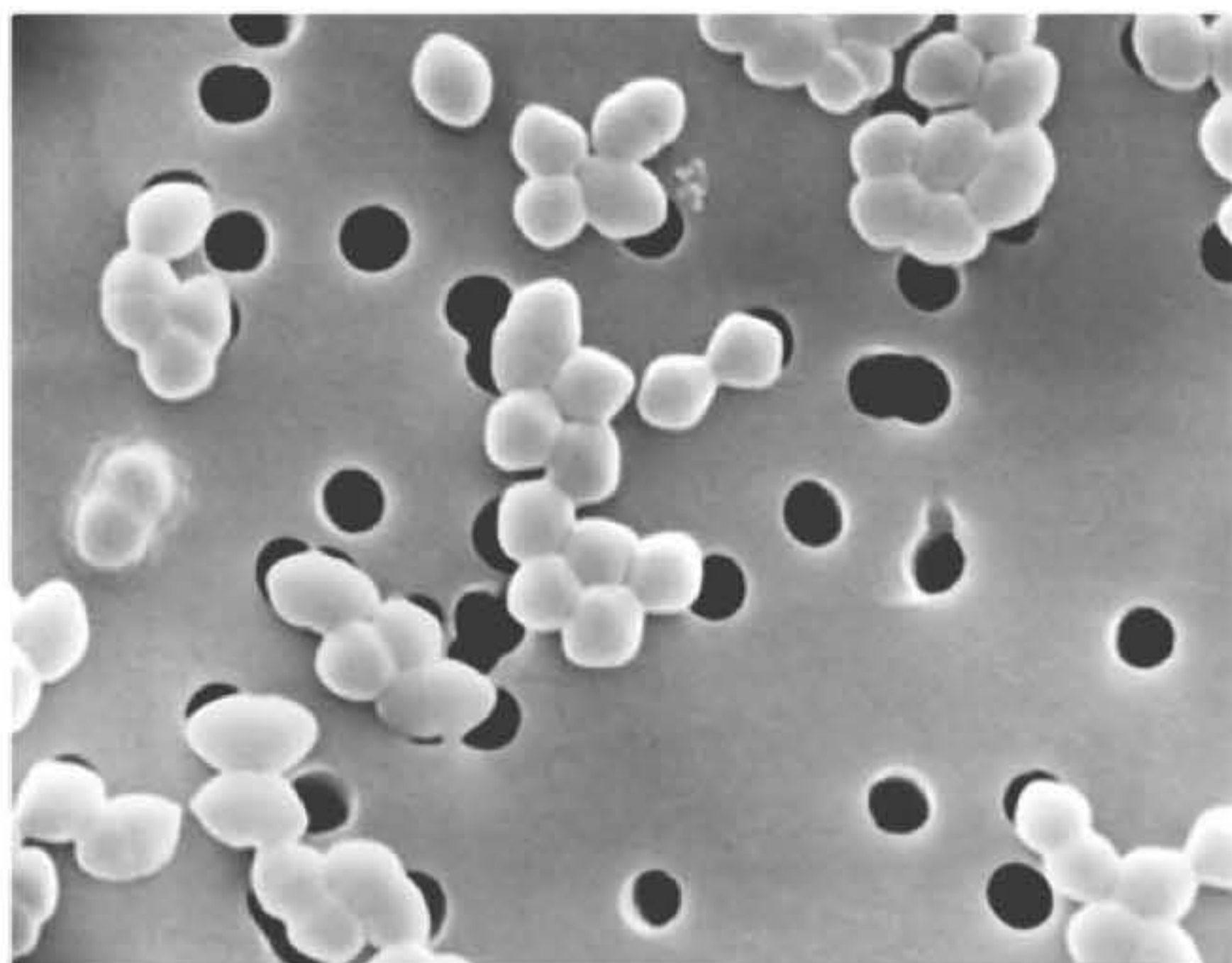


Figura 12.1 Enterococos.



*columbae* e *E. saccharolyticus*. Todas as espécies produzem leucina aminopeptidase (LAP). Os enterococos não contêm enzimas citocromos, mas podem apresentar raramente resultados falso-positivos no teste de catalase (pseudocatalase). O conteúdo de G+C no DNA é de aproximadamente 37 a 45 mol%.

Estudos preliminares mostram que a cepa de *E. faecalis* ATCC 19433 apresenta habilidades específicas de adaptação, sobrevivendo em diferentes temperaturas, pH e concentrações variadas de NaCl, SDS, sais biliares, etanol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A observação mais notável sobre essa cepa foi sua rápida desintegração aos sais biliares e SDS (a morte por detergentes foi quase instantânea), porém ela é capaz de sobreviver a grandes variações de pH, altas temperaturas (outras cepas de *E. faecalis* também

crescem a 52°C e sobrevivem muitas horas a 59°C) e altas concentrações de NaCl. O *E. faecalis* sobrevive em concentrações de 28,5% de NaCl, quantidade de sal que representa o máximo de concentração solúvel no meio *brain heart infusion* BHI, em que foram realizados os testes.

As 40 espécies atuais de *Enterococcus* e seus códigos de referência das Coleções de Cultura a que pertencem estão descritas no Quadro 12.1. (Para atualização do número de espécies consulte também a URL: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>.)

Nos últimos anos, a construção da árvore filogenética das espécies do gênero *Enterococcus* foi fundamentada principalmente na análise comparativa das sequências do gene rRNA 16S e na

**Quadro 12.1 • Relação das espécies do gênero *Enterococcus* (2010).**

Espécies	Cepa referência*	Ano de registro	Observações
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1903	Autores: <i>ex</i> Thiercelin and Jouhaud 1903; Andrewes and Horder 1906; Schleifer and Kilpper-Bälz 1984 gene. nov., nom. rev. Sinônimo: " <i>Enterococcus</i> ", Thiercelin and Jouhaud 1903
<i>Enterococcus aquimarinus</i>	API 8407116 = CCM 7283 = CCUG 51308 = LMG 16607	2005	Švec <i>et al.</i> 2005, sp. nov. Isolada da água do mar
<i>Enterococcus asini</i>	AS2 = ATCC 700915 = CCUG 44928 = DSM 11492 = LMG 18727 = NBRC 100681	1998	Isolado de mula ( <i>Equus asinus</i> )
<i>Enterococcus avium</i>	Guthof E6844 = ATCC 14025 = CCUG 7983 = CIP 103019 = DSM 20679 = JCM 8722 = LMG 10744 = NBRC 100477 = NCIMB 702369 (anteriormente NCDO 2369) = NCTC 9938 = VKM B-1673	1984	Isolado de pássaros. ( <i>ex</i> Nowlan and Deibel 1967) Collins <i>et al.</i> 1984, nom. rev., comb. nov. Sinônimo: " <i>Streptococcus avium</i> ", Nowlan and Deibel 1967
<i>Enterococcus caccae</i>	2215-02 = SS-1777 = ATCC BAA-1240 = CCUG 51564	2006	Isolada de fezes Carvalho MGS, Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Morey RE, Sampson J, Joyce K, Barrett TJ, Teixeira LM, Facklam RR: <i>Enterococcus caccae</i> sp. nov., isolated from human stools. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2006; 56: 1505-1508
<i>Enterococcus camelliae</i>	FP15-1 = KCTC 13133 = NBRC 101868 = NRIC 0105 = PCU 277 = TISTR 932	2007	Isolada de folhas de chá de camélia na Tailândia
<i>Enterococcus canintestini</i>	CCM 7285 = CCUG 37857 = CCUG 51312 = LMG 13590	2005	Isolada de intestino de cão Nota: <i>Enterococcus canintestini</i> foi previamente conhecida como <i>Enterococcus dispar-like</i>
<i>Enterococcus canis</i>	CCUG 46666 = LMG 12316 = NBRC 100695	2003	Reclassificação de <i>Enterococcus porcinus</i> , Teixeira <i>et al.</i> 2001, posterior sinônimo de <i>Enterococcus villorum</i> Vancanneyt <i>et al.</i> 2001. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2003; 53: 1069-1074
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (Vaughan <i>et al.</i> , 1979)	ATCC 25788 = CCUG 18657 = CIP 103018 = DSM 20680 = JCM 8723 = LMG 10745 = MUTK 20 = NBRC 100478 = NCIMB 11449 (anteriormente NCDO 2372) = NCTC 12361 = NRRL B-3502	1984	Sinônimo: " <i>Streptococcus casseliflavus</i> "
<i>Enterococcus cecorum</i>	A60 = ATCC 43198 = CCUG 27299 = CIP 103676 = DSM 20682 = JCM 8724 = LMG 12902 = NBRC 100674 = NCIMB 702674 (anteriormente NCDO 2674) = NCTC 12421	1983	Autor: (Devriese <i>et al.</i> 1983) Williams <i>et al.</i> 1989, comb. nov. Validation List No. 31. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 1989; 39: 495-497
<i>Enterococcus columbae</i>	STR 345 = ATCC 51263 = CCUG 27894 = CIP 103675 = DSM 7374 = LMG 11740 = NBRC 100677 = NCIMB 13013	1993	Devriese <i>et al.</i> 1993, sp. nov. Validation List No. 44. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 1993; 43: 188-189
<i>Enterococcus devriesei</i>	CCM 7299 = CCUG 37865 = LMG 14595	2005	Švec <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>Enterococcus dispar</i>	E18-1 = ATCC 51266 = CCUG 33309 = CIP 103646 = DSM 6630 = HAMBI 2231 = LMG 13521 = NBRC 100678 = NCIMB 13000 (anteriormente NCFB 2821) = NCIMB 13000	1991	Collins <i>et al.</i> 1991, sp. nov.
<i>Enterococcus durans</i>	98D = ATCC 19432 = CCUG 7972 = CIP 55.125 = DSM 20633 = JCM 8725 = LMG 10746 = NBRC 100479 = NCIMB 700596 (anteriormente NCDO 596) = NCTC 8307	1937	<i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 1984; 34: 220-223
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433 = ATCC 19433-U = CCUG 19916 = CIP 103015 = DSM 20478 = HAMBI 1711 = JCM 5803 = JCM 8726 = LMG 7937 = NBRC 100480 = NBRC 100481 = NCAIM B.01312 = NCIMB 775 (anteriormente NCDO 581) = NCTC 775	1906	(Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984, comb. nov. Outros sinônimos: " <i>Micrococcus ovalis</i> ", Escherich 1886; " <i>Streptococcus liquefaciens</i> ", Sternberg 1892; " <i>Micrococcus zymogenes</i> ", MacCallum & Hastings 1899; " <i>Enterocoque</i> ", Thiercelin 1902; " <i>Enterococcus proteiformis</i> ", Thiercelin & Jouhaud 1903; " <i>Streptococcus glycerinaceus</i> ", Orla-Jensen 1919



**Quadro 12.1 • Relação das espécies do gênero *Enterococcus* (2010) (continuação).**

Espécies	Cepa referência*	Ano de registro	Observações
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434 = CCUG 542 = CIP 103014 = CFBP 4248 = DSM 20477 = HAMBI 1710 = JCM 5804 = JCM 8727 = LMG 11423 = NBRC 100486 = NBRC 100485 = NCIMB 11508 (anteriormente NCDO 942) = NCTC 7171	1919	(Orla-Jensen 1919) Schleifer & Kilpper-Bälz 1984, comb. nov.
<i>Enterococcus flavescens</i>	CA 2 = ATCC 49996 = CCUG 30567 = CECT4481 = CIP 103525 = CCM 4239 = DSM 7370 = HAMBI 2233 = LMG 13518 = NBRC 100679	1992	Pompei <i>et al.</i> 1992, sp. nov.
<i>Enterococcus gallinarum</i>	F87/276 = PB21 = ATCC 49573 = CCUG 18658 = CIP 103013 = JCM 8728 = LMG 13129 = NBRC 100675 = NCIMB 702313 (anteriormente NCDO 2313) = NCTC 12359	1982	(Bridge and Sneath 1982) Collins <i>et al.</i> 1984, comb. nov.
<i>Enterococcus gilvus</i>	PQ1 = ATCC BAA-350 = CCUG 45553 = NBRC 100696	2002	Tyrrell <i>et al.</i> 2002, sp. nov. Pigmentação amarela pálida
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	440 = ATCC BAA-382 = CCM 4851 = CCUG 45916 = CIP 107129 = LMG 19487 = NBRC 100709	2001	Švec <i>et al.</i> 2001, sp. nov.
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	CCUG 48100 = LMG 12317	2004	Koort <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>Enterococcus hirae</i>	E.E. Snell strain R = ATCC 8043 = ATCC 9790 = CCM 2423 = CCUG 1332 = CCUG 18659 = CCUG 19917 = CIP 53.48 = CFBP 4250 = DSM 20160 = HAMBI 644 = HAMBI 1709 = IFO (agora NBRC) 3181 = JCM 8729 = LMG 6399 = NCCB 46070 = NCCB 58005 = NCIMB 6459 (anteriormente NCDO 1258) = NCTC 12367	1995	Farrow and Collins 1985, sp. nov.
<i>Enterococcus italicus</i>	CCUG 50447 = DSM 15952 = LMG 22039	2004	Fortina <i>et al.</i> 2004, sp. nov. Isolada de queijo artesanal italiano Sinônimo: <i>Enterococcus saccharominimus</i> , Vancanneyt <i>et al.</i> 2004
<i>Enterococcus malodoratus</i>	ATCC 43197 = CCUG 30572 = CIP 103012 = DSM 20681 = HAMBI 1569 = JCM 8730 = LMG 10747 = NBRC 100489 = NCIMB 700846 (anteriormente NCDO 846) = NCTC 12365	1955	(ex Pette 1955) Collins <i>et al.</i> 1984, nom. rev., comb. nov. Cepa de odor fétido Sinônimo: " <i>Streptococcus faecalis</i> subsp. <i>Malodoratus</i> ", Pette 1955
<i>Enterococcus moraviensis</i>	330 = ATCC BAA-383 = CCM 4856 = CCUG 45913 = CIP 107130 = LMG 19486 = NBRC 100710	2001	Švec <i>et al.</i> 2001, sp. nov. Isolado da água
<i>Enterococcus mundtii</i>	ATCC 43186 = CCUG 18656 = CFBP 4251 = CIP 103010 = DSM 4838 = HAMBI 1570 = JCM 8731 = LMG 10748 = MUTK 559 = NBRC 100490 = NCIMB 702375 (anteriormente NCDO 2375) = NCTC 12363	1986	Collins <i>et al.</i> 1986, sp. nov.
<i>Enterococcus pallens</i>	PQ2 = ATCC BAA-351 = CCUG 45554 = NBRC 100697	2002	Tyrrell <i>et al.</i> 2002, sp. nov. Colônias de coloração amarelada
<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	JLB-1 = ATCC BAA-412 = CCUG 48923 = DSM 14726 = KCTC 3818 = NBRC 100711	2003	Law-Brown and Meyers 2003, sp. nov.
<i>Enterococcus porcinus</i>	DS 1390-83 = ATCC 700913 = CCUG 43229 = CIP 107172 = NCIMB 13634	2001	Teixeira <i>et al.</i> 2001, sp. nov. " <i>Enterococcus villorum</i> ", Vancanneyt <i>et al.</i> 2001
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	ATCC 49372 = CCUG 33310 = CIP 103647 = DSM 5632 = JCM 8732 = LMG 11426 = NBRC 100491 = NCIMB 13084 (anteriormente NCDO 2138)	1989	Collins <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>Enterococcus raffinosus</i>	1789/79 = ATCC 49427 = CCUG 29292 = CIP 103329 = DSM 5633 = JCM 8733 = LMG 12888 = NBRC 100492 = NCTC 12192	1989	Collins <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>Enterococcus ratti</i>	DS 2705-87 = ATCC 700914 = CCUG 43228 = CIP 107173 = NBRC 100698 = NCIMB 13635	2001	Teixeira <i>et al.</i> 2001, sp. nov.
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	ATCC 43076 = CCUG 27643 = CCUG 33311 = CIP 103246 = DSM 20726 = JCM 8734 = LMG 11427 = NBRC 100493 = NCIMB 702594 (anteriormente NCDO 2594)	1985	(Farrow <i>et al.</i> 1985) Rodrigues and Collins 1991, comb. nov.
<i>Enterococcus saccharominimus</i>	CCM 7220 = LMG 21727	2004	Vancanneyt <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>Enterococcus seriolicida</i>	YT-3 = ATCC 49156 = CIP 104369 = JCM 8735 = LMG 12889	1991	Patógeno de peixes Kusuda <i>et al.</i> 1991, sp. nov. <i>Lactococcus garvieae</i> (Collins <i>et al.</i> 1984) Schleifer <i>et al.</i> 1986
<i>Enterococcus silesiacus</i>	W442 = CCM 7319 = LMG 23085	2006	Švec <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>Enterococcus solitarius</i>	885/78 = ATCC 49428 = CCUG 29293 = CIP 103330 = DSM 5634 = JCM 8736 = LMG 12890 = NBRC 100494 = NCTC 12193	1989	Collins <i>et al.</i> 1989, sp. nov. " <i>Tetragenococcus solitarius</i> ", (Collins <i>et al.</i> 1989) Ennahar and Cai 2005, comb. nov.

Continua



**Quadro 12.1 • Relação das espécies do gênero *Enterococcus* (2010) (continuação).**

Espécies	Cepa referência*	Ano de registro	Observações
<i>Enterococcus sulfureus</i>	ATCC 49903 = CCUG 30571 = CCUG 33313 = CIP 104373 = DSM 6905 = HAMB1 2232 = LMG 13084 = MUTK 31 = NBRC 100680 = NCIMB 13117 (anteriormente NCDO 2379)	1991	Martinez-Murcia and Collins 1991, sp. nov.
<i>Enterococcus termitis</i>	CCM 7300 = LMG 8895	2006	Švec <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>Enterococcus thailandicus</i>	FP48-3 = KCTC 13134 = NBRC 101867 = NRIC 0107 = PCU 282 = TISTR 933	2008	Tanasupawat <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>Enterococcus villorum</i>	88-5474 = CCM 4887 = CCUG 45025 = JCM 11557 = LMG 12287 = NBRC 100699	2001	Vancanneyt <i>et al.</i> 2001, sp. nov.

Fonte: <http://www.dsmz.de>.

\*DSM = DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemanha; ATCC = American Type Culture Collection, Corporate, EUA; CCM = Czechoslovak Collection of Micro-organisms, República Tcheca; NCTC = National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, Inglaterra, Reino Unido; JCM = Japan Collection of Micro-organisms, Japão; TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Tailândia; PCM = Polish Culture Collection of Micro-organisms, Wrocław, Polónia. LMG = Universiteit Gent, Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Bélgica; NBRC = NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE); Todas as culturas IFO foram transferidas para NBRC, Chiba, Japão; NRIC = Nodai Research Institute Culture Collection, Tóquio, Japão; KCTCFP = Korean Collection For Type Cultures, Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Yusong Taejon, Coreia.

hibridação de DNA-DNA. As novas técnicas moleculares, porém, concedem pouca atenção aos testes fisiológicos rotineiros para diferenciar as novas espécies de *Enterococcus* e *Streptococcus*.

Os métodos moleculares mais utilizados são: perfil de proteínas totais, o uso de sondas para genes específicos, como o *Enterococcus* GenProbe®, o uso de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) para D-alanil-D-alanina ligase (*E. faecalis* e *E. faecium*), detecção do gene vanC-1 (*E. gallinarum*), do gene vanC-2/3 (*E. casseliflavus*, “*E. flavescens*”) e ITS-PCR entre 16S e 23S rRNA.

A técnica ITS-PCR usa a região intergênica 16S-23S do rDNA para diferenciação de isolados de *Enterococcus* de origem humana e não humana provenientes de corpos d’água contaminados por poluição fecal, como ferramenta para identificação da origem da poluição. Identificar a origem da contaminação é uma etapa crítica para uma avaliação precisa e ações de controle bem-sucedidas e a detecção de *Enterococcus* spp. utilizando métodos microbiológicos clássicos não fornece informação a respeito da origem dessa poluição fecal. Técnicas de sequenciamento dos genes 16S e hibridização de DNA tam-

bém são utilizadas. Porém, nenhuma dessas técnicas substitui as provas tradicionais, consideradas como padrão-ouro.

A identificação de isolados bacterianos em nível de gênero é realizada de acordo com a reação à coloração de Gram, crescimento e escurecimento do meio de cultura ágar bile-esculina; crescimento na presença de 6,5% de NaCl, ausência de catalase e presença de pirrolidonil-arilamidase (PYR). A identificação em nível de espécie pode ser realizada por meio de painéis de testes bioquímicos. A identificação também pode ser realizada por sistemas automatizados, como o VITEK® 2 (software versão 1.02) ou RapidID32Strep® V2.0, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para complementar a classificação de cocos gram-positivos por gênero são utilizados os painéis de identificação do Quadro 12.2, que mostra as características fenotípicas dos diversos gêneros que agrupam os cocos gram-positivos, catalase-negativos.

Uma vez definido o gênero *Enterococcus* spp., devem ser observadas as características fenotípicas das principais espécies de *Enterococcus* para determinar a espécie em questão (detalhamento no Quadro 12.3).

**Quadro 12.2 • Características fenotípicas de cocos gram-positivos, catalase-negativos.**

Cocos gram-positivos	Vancomicina	Gás	Piruvato	Leucina amino peptidase	NaCl	10°C	45°C	Motilidade	Hemólise	Aspecto microscópico
<i>Enterococcus</i>	S	–	+	+	+	+	+	V	Alfa/não	Cadeias
<i>Lactococcus</i>	S	–	+	+	V	+	–	–	Alfa/não	Cadeias
<i>Vagococcus</i>	S	–	+	+	+	+	–	+	Alfa/não	Cadeias
<i>Streptococcus</i>	S	–	–	+	V	–	V	–	Alfa/beta/não	Cadeias
<i>Abiotrophia</i>	S	–	+	+	–	–	–	–	Alfa	Cadeias
<i>Globicatella</i>	S	–	+	–	+	–	–	–	Alfa	Cadeias
<i>Leuconostoc</i>	R	–	–	–	V	+	V	–	Alfa/não	Cadeias
<i>Weissella</i>	R	–	–	–	+	V	V	–	Alfa/não	Cadeias
<i>Pediococcus</i>	R	–	–	+	V	–	+	–	Alfa	Agrupados
<i>Tetragenococcus</i>	S	–	–	+	+	–	+	–	Alfa	Agrupados
<i>Aerococcus</i>	S	–	+	–	+	–	–	–	Alfa	Agrupados
<i>Helmococcus</i>	S	–	+	–	+	–	–	–	Não	Agrupados
<i>Gemella</i>	S	–	+	V	–	–	–	–	Não	Agrupados
<i>Alloiococcus</i>	S	–	+	+	+	–	–	–	Não	Agrupados
<i>Dolosigranulum</i>	S	–	+	+	+	–	–	–	Não	Agrupados
<i>Facklamia</i>	S	–	+	+	+	–	–	–	Não	Agrupados
<i>Ignavigranum</i>	S	–	+	+	+	–	–	–	Alfa	Agrupados

S = sensível; R = resistente; V = variável. Adaptado de Teixeira e Facklam, 1998.



**Quadro 12.3 • Características fenotípicas usadas na identificação das espécies mais frequentes de *Enterococcus*.**

Espécies de <i>Enterococcus</i>	Características fenotípicas <sup>a</sup>											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MPG
<b>Grupo I</b>												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. saccharolyticus</i> <sup>b</sup>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
" <i>E. hawaiiensis</i> "	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>Grupo II</b>												
<i>E. faecium</i>	+ <sup>c</sup>	-	+	+	V	V	-	-	-	+ <sup>c</sup>	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ <sup>c</sup>	+	V	+	-	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+ <sup>c</sup>	+	-	+	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	+ <sup>c</sup>	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-	+	-	-	+ <sup>c</sup>	+	-
<i>E. haemoperoxidus</i> <sup>b</sup>	+ <sup>d</sup>	-	+ <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
" <i>E. sanguinicola</i> "	+	-	+	-	-	-	+ <sup>e</sup>	-	-	+	-	-
<b>Grupo III</b>												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo IV</b>												
<i>E. cecorum</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculi</i> <sup>b</sup>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. asini</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. ceccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+ <sup>d</sup>
<b>Grupo V</b>												
<i>E. canis</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. moraviensis</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermanniensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+

<sup>a</sup>MAN = manitol; SOR = sorbose; ARG = arginina; ARA = arabinose; SBL = sorbitol; RAF = rafinose; TEL = 0,04% de telurito; MOT = motilidade; PIG = pigmento; SUC = sacarose; PYU = piruvato; MPG = methyl- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo; + = 90% ou mais das cepas são positivas; - = 90% ou mais das cepas são negativas; V = variável (11 a 89% das cepas são positivas). <sup>b</sup>Características fenotípicas fundamentadas em dados de tipagem de cepas. <sup>c</sup>Exceções ocasionais podem ocorrer (< 3% das cepas mostram reações diversas). <sup>d</sup>Positividade tardia (3 ou mais dias de incubação). <sup>e</sup>Reação fraca. Adaptado de Teixeira, Carvalho e Facklan, 2007.

## ► Significado clínico e epidemiologia

A resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis aumentou drasticamente na última década. A propagação de cepas bacterianas multirresistentes dentro de hospitais tornou-se uma ameaça que impõe medidas de controle rigorosas.

Os enterococos resistentes à vancomicina (ERV) foram primeiramente documentados na Europa ocidental por Leclerc *et al.*, em 1988. Os ERV são microrganismos bem adaptados, que podem sobreviver por longos períodos de tempo em superfícies, e são definidos como: enterococos exibindo concentração inibitória mínima (CIM) a vancomicina de 4  $\mu$ g/ml e resistentes contra diversos antibióticos incluindo penicilinas, cefalosporinas, clindamicinas e aminoglicosídeos.

Pode ocorrer transmissão hospitalar pelo contato do paciente colonizado por ERV-endêmico para outro paciente e do profissional de saúde para o paciente. A preocupação dos epidemiologistas é que ocorra transferência da resistência ao antibiótico glicopeptídico vancomicina adquirida ou intrínseca dos enterococos para os *Staphylococci aureus* multirresistentes e somente sensíveis à vancomicina, microrganismo importante nas infecções hospitalares, o que prolongaria a internação do paciente e aumentaria a mortalidade.

Essa hipótese sobre possibilidade de troca de informações genéticas de resistência a antibióticos entre os gêneros *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. foi testada *in vitro* e os experimentos demonstraram que é possível a transferência de genes de resistência à vancomicina entre gêneros diferentes.



Profissionais de saúde têm um importante papel a desempenhar na prevenção e controle de ERV no ambiente hospitalar. A simples lavagem das mãos de maneira correta e frequente pode contribuir significativamente para prevenir e controlar a propagação do ERV. A educação continuada dos profissionais de saúde e recursos é importante na prevenção de cepas ERV.

### ▪ Breve histórico sobre a resistência dos *Enterococcus* à vancomicina

Na década de 1950, descobriu-se que o uso de antibióticos em rações animais favorecia o ganho de peso em mamíferos e aves. Com essa informação, muitos grupos químicos de antibióticos foram usados indiscriminadamente na área veterinária, principalmente na suinocultura e avicultura, fato que pode ter relação direta na seleção de resistência bacteriana a alguns antimicrobianos.

O uso de avoparcina em rações – um glicopeptídeo bastante semelhante à vancomicina – é associado ao isolamento de ERV em alimentos de origem animal, especialmente frangos de corte, como mostram estudos epidemiológicos realizados na Dinamarca, Noruega e Holanda. Outras evidências indicam que pode haver transmissão de ERV para pessoas que mantêm contato com essas fontes, resultando em reservatórios humanos dessa bactéria. Como comentado, a contaminação ambiental oferece um reservatório importante para futuros focos de ERV, perpetuando a transmissão do microrganismo inclusive nas instituições de saúde.

O aparecimento de amostras de enterococos apresentando perfil de multirresistência a antibióticos (*E. faecalis* e *E. faecium*) e carreando o gene *vanA*, inicialmente na União Europeia (UE), rapidamente se estendeu aos EUA e Austrália, mobilizando a comunidade científica nos anos 1990 no sentido de definir os mecanismos de resistência, sobretudo aos glicopeptídeos.

A relação entre colonização por ERV de aves usadas na produção de alimentos e a colonização de seres humanos pela bactéria foi primeiramente sugerida por Bates *et al.* (1993, 1994) que recolheram amostras de enterococos resistentes à vancomicina com ribotipos idênticos nas carcaças de frango de origem comercial e de humanos.

Desde 2000, a União Europeia monitora regularmente a presença de ERV em fazendas de criação animal, principalmente de aves, com culturas do conteúdo cecal em meio seletivo para ERV suplementado com 16 mg/ℓ de vancomicina.

Além da identificação da espécie, é determinada a resistência a antimicrobianos, a genotipagem da resistência à vancomicina, o sequenciamento para tipagem multilocus (MLST – *multilocus sequence typing*) e caracterização do transpóson Tn1546.

No início do monitoramento em 2000, a proporção de amostras positivas para ERV na Europa era baixa, cerca de 1%. Porém, em 2005 já estava próxima a 40%. Após a implantação de medidas de controle, houve um decréscimo, entre 2005 e 2006, permanecendo estável em 30% desde então. As cepas de *E. faecium* isoladas de aves têm antibiogramas similares, a mesma sequência MLST e ocorrência do transpóson TN 1546, sugerindo que foram disseminadas a partir de um clone principal e em um ambiente sem qualquer pressão seletiva óbvia.

O uso irregular de antibióticos na área veterinária é uma das diversas hipóteses que tentam justificar o aparecimento de resistência a glicopeptídeos. De fato, há duas correntes principais, levando em conta a epidemiologia dos enterococos resistentes: nos EUA há predomínio de ERV nos hospitais; e, na Europa, predomina colonização por ERV na comunidade.

Apesar da ausência de dados que justifiquem a aquisição de ERV fora do ambiente hospitalar nos EUA, os inúmeros relatos de pesquisadores europeus sugerem que a aquisição da bactéria ocorre frequentemente na comunidade, a partir do meio ambiente, encontrados nas fezes de animais e alimentos de origem animal destinados ao consumo humano.

A descontinuidade do uso de avoparcina na UE pretendeu evitar que um *pool* de genes de resistência influenciasse a situação de resistência a antimicrobianos nos serviços de saúde humana, no qual cepas animais poderiam ter contato com humanos por meio da cadeia alimentar. Porém, apenas uma pequena proporção de enterococos na flora intestinal de frangos são EVR, e uma vez que a carne de frango é cuidadosamente tratada termicamente antes do consumo, o risco de transmissão da bactéria do animal para o humano é baixo.

Até 1997 não havia registro de EVR nos hospitais brasileiros, com raros estudos sobre epidemiologia ou perfil de resistência de enterococos isolados nas comunidades brasileiras e de origem veterinária, porém a situação mudou. No Sul e Sudeste do Brasil existem relatos de resistência *vanA* clássicas, assim como de fenótipos de resistência *vanB* com genótipo *vanA* (*E. faecalis*, grupo clonal HLR-GE/ST – altos níveis de resistência a aminoglicosídeos), *vanB*, dentre outros. O Quadro 12.4 mostra os diversos genótipos e fenótipos de resistência dos enterococos.

**Quadro 12.4 ▪ Resistência intrínseca em *Enterococcus*.\***

Organismos	Ácido fusídico	Ceftazidima	Cefalosporinas (exceto ceftazidima)	Aminoglicosídeos	Lincosamidas	Quinupristina-dalfopristina	Vancomicina	Teicoplanina	Fosfomicina	Novobiocina	Nitrofurantoína	Sulfametoxazol-trimetoprima
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	LLR	R	R	–	–	–	–	–	(R) <sup>1</sup>
<i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>casseliflavus</i>	R	R	R	LLR	R	R	R	–	–	–	–	(R) <sup>1</sup>
<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	R	LLR <sup>2</sup>	–	–	–	–	–	–	–	(R) <sup>1</sup>

\*Bactérias gram-positivas também são intrinsecamente resistentes a aztreonam, temocilina, polimixina B/colistina e ácido nalidíxico.

LLR = baixa resistência aos aminoglicosídeos. Combinações de aminoglicosídeos com inibidores de parede celular (penicilinas e glicopeptídeos) são sinérgicas e bactericidas contra isolados que são suscetíveis a inibidores de parede celular e não exibem o alto nível de resistência a aminoglicosídeos.

<sup>1</sup> Enterococos são normalmente sensíveis *in vitro* para sulfametoxazol-trimetoprima, embora sejam resistentes a sulfonamidas sozinhas. O uso de sulfametoxazol-trimetoprima contra enterococos permanece controverso. Provavelmente é melhor evitar seu uso em infecções graves.

<sup>2</sup> Além do baixo nível de resistência a aminoglicosídeos, *E. faecium* produz uma enzima AAC(6') cromossômica que é responsável pela perda de sinergias entre aminoglicosídeos (exceto estreptomicina, amicacina e estreptomicina) e penicilinas ou glicopeptídeos.

Adaptado de Intrinsic resistance in gram-positive bacteria. EUCAST Expert Rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April, 2008.



Nos EUA, onde os ERV são predominantemente de origem hospitalar, relaciona-se a resistência pelo uso clínico descontrolado de vancomicina nas infecções por *S. aureus* multirresistentes, sensíveis somente à vancomicina (Bates, 1997) e nas colites por *Clostridium difficile*.

Portanto, há duas situações epidemiológicas distintas: na Europa, há predomínio de ERV na comunidade, colonizando a população, e nos EUA os ERV predominam nos hospitais. O Brasil encontra-se em uma posição peculiar: faz uso inadequado de vancomicina em seus hospitais e, provavelmente, seguirá o padrão americano de disseminação de enterococos resistentes a glicopeptídios. No entanto, utilizou avoparcina na área veterinária por aproximadamente dez anos, o que o aproxima da situação epidemiológica europeia.

Com base nos dados europeus sobre a resistência adquirida dos enterococos de origem aviária a glicopeptídios pelo uso de avoparcina, entre 1996 e 1998 foi realizado um estudo preliminar em São Paulo, sudeste do Brasil, com o objetivo de avaliar o impacto ecológico do uso de avoparcina nas granjas da região. Testes de detecção de resistência foram incluídos nas normas sanitárias de vários países para detectar a presença de cepas ERV em alimentos à base de carne, o que contribuiu para que o Brasil também proibisse o uso de avoparcina em seus plantéis de frango (visto que o país é um grande exportador de carne de frango) e poderia sofrer sanções comerciais. Nesse estudo, não foram detectados enterococos resistentes à vancomicina nas granjas que faziam uso da avoparcina, porém as cepas já apresentavam um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de glicopeptídios quando comparadas às CIM de enterococos isolados em granjas que não utilizavam a avoparcina.

Mesmo com a proibição de uso de glicopeptídios na área de criação animal – recomendada pela comunidade europeia –, muitos países em desenvolvimento da América Latina e Ásia seguiram usando antibióticos. Embora a restrição oficial de uso de glicopeptídios como promotores de crescimento animal, o isolamento de ERV em aves tem aumentando gradualmente em alguns países mais uma vez.

## ■ Resistência dos enterococos a antibióticos

A variabilidade genética e a multiplicação acelerada permitem que as bactérias desenvolvam mutações específicas para adaptar-se a ambientes adversos. Uma mutação conferindo resistência a determinada substância permitirá que a bactéria sobreviva à ação de antibióticos usados nos procedimentos terapêuticos. Dois fatores têm acelerado o desenvolvimento de resistência: o acúmulo de resistências adquiridas para uma determinada bactéria patogênica, quando classes inteiras de antibióticos tornam-se inativas contra ela; a ausência de novas classes de antimicrobianos nos últimos anos.

### Métodos laboratoriais de triagem de enterococos resistentes

Os métodos de triagem de enterococos resistentes variam de acordo com o autor e tipo de resistência que se pretende determinar – *intrínseca* ou *adquirida*. Estuda-se resistência intrínseca a níveis baixos de aminoglicosídeos, valores de CIM relativamente elevados a betalactâmicos, níveis baixos a lincosaminas e resistência à vancomicina (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). Para avaliar a efetividade clínica de combinações de antibióticos contra cepas ERV, são realizados somente testes *in vivo*.

Nas avaliações epidemiológicas para detecção de resistência de enterococos a grupos específicos de antibióticos – gli-

copeptídios, aminoglicosídeos e betalactâmicos –, são usadas muitas amostras. É preciso atenção à técnica de triagem adotada, principalmente em relação às concentrações de antibióticos adicionadas aos meios de cultura.

O monitoramento da infecção por enterococos resistente a glicopeptídio (ERG) é uma das principais ferramentas do controle de infecção relacionada com a assistência hospitalar. As ações incluem coleta sistemática de *swabs* retais em unidades hospitalares de riscos (portador assintomático de ERG) associada a uma técnica de isolamento da bactéria e perfil de resistência. Há diversos métodos disponíveis, como a técnica de PCR multiplex e posterior hibridização – Génotype® Enterococcus | Hain Lifescience – ou os métodos clássicos de triagem usando a inoculação direta de amostras em meio seletivo. Estes, porém, podem subestimar os dados de enterococos multirresistentes em portadores assintomáticos e, portanto, devem ser utilizados com muito critério e atenção em estudos clínicos.

As cepas multirresistentes de enterococos podem apresentar perfis variados de resistência a antibióticos. Atualmente, estuda-se a resistência a altos níveis de aminoglicosídeos (*high-level aminoglycoside resistance* – HLAR) à gentamicina e estreptomicina utilizando-se métodos padronizados de seleção em placas de ágar Mueller-Hinton com 500 µg/ml de gentamicina ou 2.000 µg/ml de estreptomicina e difusão em disco, usando discos com 120 µg/ml de gentamicina e 300 µg/ml de estreptomicina, utilizando como cepas-controle nos testes de suscetibilidade o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os Quadros 12.4 e 12.5 resumem os padrões conhecidos de resistência a antibióticos glicopeptídios e resistência intrínseca de *Enterococcus*.

A resistência à vancomicina é resultado de genes múltiplos, sugerindo que ela não foi adquirida recentemente. A maioria dos enterococos são naturalmente resistentes a vários antibióticos (resistência intrínseca – Quadro 12.6), incluindo cefalosporinas e penicilinas resistentes à penicilinase (p. ex., oxacilina) e às concentrações clínicas aceitáveis de clindamicina e aminoglicosídeos.

Quando comparados aos estreptococos, a maioria dos enterococos é relativamente resistente à penicilina, ampicilina e ureidopenicilinas, com concentrações inibitórias mínimas de 1 a 8 mg/ml para a maioria dos *Enterococcus faecalis* e ainda mais altas para a maioria dos *Enterococcus faecium*. Muitos enterococos são tolerantes aos efeitos inibitórios dos antibióticos ativos contra a parede celular, incluindo ampicilina e vancomicina; sugerindo que essa propriedade pode não ser inerente, mas adquirida após exposições sistemáticas a antibióticos.

Além da resistência natural a diversos antibióticos, os enterococos ainda desenvolveram resistência mediada por plasmídios e transpósons para as tetraciclinas, minociclinas, doxiciclinas, eritromicina e compostos recentemente desenvolvidos, como azitromicina e claritromicina, resistência ao cloranfenicol, resistência a altos níveis de trimetoprima e altos níveis de clindamicina.

A capacidade de *E. faecalis* em adquirir características de múltipla resistência a antibióticos pode ser resultado de mecanismos diferentes e distintos de conjugação entre bactérias. A identificação laboratorial das resistências adquiridas pelas cepas hospitalares de enterococos auxilia o médico na escolha do tratamento do paciente e no uso racional de antibióticos.

O estudo dos mecanismos de transferência de resistências adquiridas entre gêneros bacterianos por conjugação é dos grandes desafios atuais.



**Quadro 12.5 • Características e tipos de resistência a glicopeptídeos.**

Característica	Tipo					
	Van A	Van B	Van C	Van D	Van E	Van G
Fenótipo	Resistência à vancomicina e teicoplanina	Resistência à vancomicina	Resistência à vancomicina	Resistência à vancomicina e teicoplanina	Resistência à vancomicina	Resistência à vancomicina
Concentração inibitória mínima de vancomicina µg/ml	64 a > 1.000	4 a > 1.000	2 a 32	64 a 128	16	16
Concentração inibitória mínima de teicoplanina µg/ml	16 a 512	0,5 a 1	0,5 a 1	4 a 64	0,5	0,5
Genótipo	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
Produtos	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	?
Determinante genético	Adquirida	Adquirida	Intrínseca	Adquirida	Adquirida	Adquirida
Expressão	Induzida	Induzida	Constitutiva	Constitutiva	Induzida	Induzida
Localização dos genes de resistência	Plasmídios Cromossomo	Cromossomo Plasmídio	Cromossomo	Cromossomo	?	Cromossomo
Espécies em que os fenótipos são encontrados mais frequentemente	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundt</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. galinarum</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Transferível	Sim	Sim	Não	Não	Sim*	Sim

Adaptado de EUCAST Expert Rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April, 2008; Murray BN. N. Engl J Med 2000; 342:710-721 e Centinkaya Y *et al.*; Clin Microbiol Ver 2000;13:686-707. \* Depardieu & Courvalin, 2003.

**Quadro 12.6 • Fenótipos excepcionais encontrados nos *Enterococcus*.**

Organismos	Fenótipos excepcionais
<i>Enterococcus</i> spp.	Resistência a linezolida, daptomicina, tigeciclina. Resistência a teicoplanina, mas não a vancomicina
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus avium</i>	Suscetível a quinupristina-dalfopristina. Considerar a possibilidade de confundir a identificação. Se também é resistente à ampicilina, certamente é <i>E. faecium</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente a quinupristina-dalfopristina. Considerar a possibilidade de confundir a identificação, especialmente se for também suscetível à ampicilina

Adaptado de EUCAST Expert Rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April, 2008.

O sistema mais estudado de conjugação envolve a participação de oligopeptídeos denominados feromônios e plasmídios de resposta a feromônios. Cepas de *E. faecalis* secretam no meio de cultura inúmeros feromônios sexuais, peptídeos de vários tipos com baixo peso molecular para diferentes plasmídios. Quando uma célula contendo um plasmídio de resposta a feromônio (uma célula potencialmente doadora) entra em contato com o peptídeo correspondente ao seu feromônio, ocorre ligação de um gene de transcrição do plasmídio, resultando na síntese de uma substância agregadora na superfície celular. Quando uma célula doadora entra em contato com outras células de *E. faecalis*, essa substância agregadora, que contém duas moléculas de Arg-Gly-Asp principais, adere ao ligante equivalente na superfície da maioria das células de *E. faecalis*, levando à formação de grumos bacterianos. Por um processo ainda não conhecido, o plasmídio de resposta a feromônio pode, então, ser transferido de uma célula doadora para uma célula bacteriana receptora. Uma vez que a célula receptora tenha adquirido seu plasmídio particular, a síntese do feromônio correspondente é inibida para prevenir a autoagregação. Esse sistema de agregação ocorre primariamente em *E. faecalis*, sendo altamente eficiente, resultando na transferência de plasmídios *in vitro* em caldos de cultura ou filtros.

Outro sistema de conjugação, também não muito conhecido, envolve plasmídios de conjugação heterogênea que podem ser transferidos do hospedeiro para diversos gêneros bacterianos, como estreptococos e estafilococos, e entre espécies de enterococos. A frequência de transferência é menor que a do sistema de feromônios e é mais eficiente *in vitro* em filtros do que em caldo de cultura. Uma vez que os estafilococos, os estreptococos e enterococos dividem inúmeros genes de resistência, esse tipo de plasmídio pode ser o mecanismo pelo qual os genes de resistência se difundem entre os diferentes gêneros.

Um terceiro tipo de conjugação, que envolve transpósons, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de difusão de genes de resistência para espécies muito diferentes. Assim como os transpósons comuns, que podem saltar de um determinado sítio do DNA para outro, os transpósons conjugativos também codificam a habilidade de fazer conjugação entre diferentes células bacterianas. Os plasmídios típicos requerem processos bioquímicos bastante complexos para conjugação, geralmente dependendo do êxito de interações com proteínas de bactérias receptoras, podendo apresentar problemas adicionais de exclusão de superfície e incompatibilidade. Os transpósons conjugativos, que não se replicam, mas, em vez



disso, inserem-se nos cromossomos ou em um plasmídio de um novo hospedeiro, parecem ser até mesmo mais eficientes e de maior alcance na disseminação de um gene de resistência. Esse mecanismo pode explicar a difusão do gene *tetM* do transpóson conjugativo *Tn916* entre as espécies gram-positivas a partir de organismos gram-negativos, incluindo gonococos, meningococos e *Haemophilus ducreyi*, assim como micoplasmas e ureaplasmas, dentre outros. Os transpósons conjugativos também carregam outros genes de resistência, incluindo os que codificam resistência a eritromicina e canamicina; são frequentemente relacionados com o *Tn916*. Cada transpóson pode estar envolvido com um *Tn916* ancestral; sua emergência sugere a possibilidade de disseminação posterior de resistência entre organismos gram-positivos. Os relatos sobre aglomerados de gene *vanB* com elementos cromossômicos conjugativos que parecem similares, pelo menos na função com transpósons conjugativos, mostram que esses mecanismos podem incrementar a resistência.

## ► Interpretação do diagnóstico laboratorial

O estudo da disseminação de amostras resistentes de enterococos deve ser realizado criteriosamente. Como exemplo, a triagem de pacientes internados em unidades de terapia intensiva, mais expostos a infecções hospitalares por enterococos multirresistentes, pode ser realizada com uma coleta de *swab* retal ou perianal, tomando-se o cuidado de usar *swabs* com hastes flexíveis, pois os de cabo de madeira podem se quebrar e ferir o paciente. O material pode ser diluído em solução fisiológica ou caldo de cultura (MHB) e encaminhado ao laboratório para análise.

Os enterococos são facilmente isolados em meios de cultura líquido ou sólido. Meios contendo sangue de carneiro desfibrinado são úteis para visualizar a hemólise (variável –  $\alpha$ ,  $\beta$  ou não hemolíticos), a bile-esculina também ajuda na identificação. Meios seletivos como Enterococcosel® são recomendados no caso de triagem ou controle de infecção hospitalar por enterococos resistentes à vancomicina. Há diversos meios cromogênicos disponíveis – Chromagar VRE®, chromID VRE® [C-ID], chromID VRE® (cIDVRE) – preparados para detecção direta de EVR, comparáveis em qualidade, porém alguns com tempo menor de incubação para início da detecção das cepas resistentes (cIDVRE – 24 h), cujo uso facilita o tempo de implementação dos procedimentos de controle de infecção.

A determinação correta da espécie de enterococos passou a ter maior importância clínica visto que a espécie tem relação direta com o aumento de resistência a antimicrobianos, principalmente nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. A identificação correta do gênero e da espécie de isolados resistentes à vancomicina é primordial, pois existem gêneros intrinsecamente resistentes a glicopeptídios. Nas investigações de genótipos de resistência deve-se ter certeza da identificação correta da espécie de enterococo, pois a tipagem molecular para caracterização de genes de resistência a glicopeptídios é bastante trabalhosa e dispendiosa.

O uso de cepas referência da American Typing Culture Collection (ATCC) é recomendado, pois muitas espécies apresentam reações variáveis às diferentes provas bioquímicas, podendo ser confundidas entre si. O Quadro 12.1 indica as cepas referência que podem ser usadas nos testes de identificação fenotípica.

## ► Considerações finais

Na análise e na interpretação dos dados de resistência a antimicrobianos é importante a atualização frequente dos valores de referência sobre a concentração inibitória mínima de cada antibiótico. A busca de dados deve ser realizada com critério em organizações de renome internacional. Recomenda-se consultar as tabelas oferecidas pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST (<http://www.eucast.org>), nos quais estão disponíveis os valores de *cut-off* da maioria dos antibióticos em uso na atualidade. A identificação correta da espécie também é muito importante para o acompanhamento do desenvolvimento de novos mecanismos de resistência dos enterococos. O uso de métodos sofisticados, porém sem critério na identificação correta, pode comprometer todo o trabalho do pesquisador.

## ► Bibliografia

- Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1995; 1:255-257.
- Aarestrup FM, Ahrens P, Madsen M *et al.* Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40(8):1938-1949.
- Allen NE, Hobbs JN, Nicas TI. Inhibition of peptidoglycan in vancomycin-susceptible and resistant bacteria by a semisynthetic glycopeptide antibiotic. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 1996; 40(10):2356-2362.
- Antalek M, Mylotte JM, Lesse A *et al.* Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin. *Clin Infect Dis* 1995; 20(1):103-109.
- Arthur M, Depardieu F, Snaith H *et al.* Contribution of Van Y D, D-Carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38(9): 1899-1903.
- Bager F, Madsen M, Christensen J *et al.* Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med* 1997; 31(1-2):95-112.
- Baker CN, Tenover FC. Evaluation of alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2654-2659.
- Baptista M, Departieu F, Courvalin P *et al.* Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40(10):2291-2295.
- Bates J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J Hosp Infect* 1997; 37(2):89-101.
- Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1994; 34:507-516.
- Bates J, Jordens Z, Selkon JB. Evidence for animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1993; 342:490-491.
- Bogaard AE, London N, Driessen C *et al.* Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. *N Engl J Med* 1997 Nov 20; 337(21): 1558-1559.
- Byers KE, Durbin LJ, Simonton BM *et al.* Disinfection of hospital rooms contaminated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19(4):261-264.
- Caiaffa Filho HH, Almeida GD, Oliveira GA. Laboratory of Medical Investigation LIM 03, Pathology.
- Caiaffa Filho HH, Almeida GD, Oliveira GA *et al.* Molecular characterization of van genes found in vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal Infectious Diseases* 2003;7(3):173-174.
- Carvalho MG, Steigerwalt AG, Morey RE *et al.* Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. *Clin Microbiol* 2004 Mar; 42(3):1192-1198.
- Chenoweth C, Schaberg D. The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 9:80-89.



- Clewell DB, Keith EW. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. Plasmid 1989; 21:175-184.
- Cohen M. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. Science 1992; 257(2108): 1061-1063.
- Collins MD, Farrow JAE, Jones D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 1986; 36(1): 8-12.
- Collins MD, Jones D, Farrow JA *et al.* *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1984; 34(27):220-223.
- Collins MD, Rodrigues UM, Pigott NE *et al.* *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. Lett Appl Microbiol 1991;12:95-98.
- Cormican MG, Erwin M, Jones R. Avoparcin, a glycopeptide used in animal foods:antimicrobial spectrum and potency tested against human isolates from the United States. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29:241-248.
- Costa PM, Bica A, Vaz-Pires P *et al.* Changes in antimicrobial resistance among faecal enterococci isolated from growing broilers prophylactically medicated with three commercial antimicrobials. Prev Vet Med 2009 Oct 10.
- Das I, Fraise A, Wise R. Are glycopeptide-resistant enterococci in animal a threat to human beings? Lancet 1997; 349:9057.
- Deibel RH, The Group D. Streptococci Bacteriol Rev 1964; 28:330-366.
- Depardieu F, Courvalin P. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (43rd: 2003: Chicago, Ill.). Regulation of Expression of Vancomycin Resistance in VanG-Type *Enterococcus faecalis*. Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2003 Sep 14-17; 43: abstract no. C1-1737.
- Derlot E, Courvalin P. Mechanisms and implications of glycopeptide resistance in enterococci. Am J Med 1991; 91(Suppl 3B):82S-85S.
- Descheemaeker P, Lammens C, Pot B *et al.* Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 555-561.
- Dever L, Smith S, Handwerger S *et al.* Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33(10):2770-2773.
- Devriese LA, Bruno P, Van Damme L *et al.* Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. Int J Food Microbiology 1995; 26:187-197.
- Devriese LA, Clyssens K, Rodrigues UM *et al.* *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. FEMS Microbiol Lett 1990; 71:247-251.
- Donnelly JP, Voss A, Witte W *et al.* Reply to: Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? [letter] J Antimicrob Chemother 1996; 37:390-392.
- Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M *et al.* Sequence of the vanC gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine: D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. Gene 1992; 112:53-58.
- Elliot JA, Fakclam RR. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. J Clin Microbiol 1996; 34:1296-1298.
- Etheridge ME, Yolken RH, Vonderfecht S. *Enterococcus hirae* implicated as a cause of diarrhea in suckling rats. J Clin Microbiol 1988; 26:1741-1744.
- Fabretti F, Huebner J. Implant infections due to enterococci: Role of capsular polysaccharides and biofilm Int J Artificial Organs 2005 Nov 28; (11):1079-1090.
- Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002 Oct;15(4):613-630.
- Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA *et al.* Manual of Clinical Microbiology 2007, v. 1, 9<sup>th</sup> ed. Washington, American Society for Microbiology, USA, p. 430442.
- Facklam R, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27:731-734.
- Facklam R, Sahm DA. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA (ed.). Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, American Society for Microbiology 1995; p. 308-14.
- Facklam RR, Carvalho MG, Teixeira L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore MS. The enterococci pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002.
- Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27: 731-734.
- Farrow JAE, Collins MD. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. International Journal of Systematic Bacteriology 1985; 35(1), 73-75.
- Feighner SD, Dashkevich MP. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. Appl Environ Microbiol 1987; 53(2) 331-336.
- Felmingham D, Brown DF, Soussy CJ. European Glycopeptide Susceptibility survey of Gram-positive bacteria for 1995. European Glycopeptide Resistance Survey Study Group. Diag Microbiol Infect Dis 1998; 31(4):563-571.
- Ferreti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2''-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. J Bacteriol 1986; 167:631-638.
- Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM *et al.* Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003 Dec; 3954-3959.
- Freeman R, Kearns AM, Lighfoot NF. Heat resistance of nosocomial enterococci. Lancet 1994; 344(2):64-65. [Letter]
- Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM *et al.* Factors associated with the development of antibiotic-resistant bacteria. A Internal Medicine, 2001; 135: S57. Disponível em: <http://annals.highwire.org/cgi/reprint/135/3/175.pdf>. Acesso em: 10 ago 2007.
- Fuentefria BD, Einsfeld A, Corção2 G. Use of 16s-23s RDNA intergenic Ss-spacer to differentiate *Enterococcus* isolates from human and non-human sources. Revista Eletrônica Biociências Dez. 2006; 14(2): 150-155. URL: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fabio/article/viewFile/233/196>.
- Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP *et al.* Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em um hospital universitário no Brasil. Rev Saúde Públ 2005; 39: 41-46.
- Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiol 2008 Aug; 25(5):668-675. Epub 2008 Apr 7.
- Grabsch EA, Chua K, Xie S *et al.* Improved detection of vanB2-containing *Enterococcus faecium* with vancomycin susceptibility by Etest using Oxgall supplementation. Journal of Clinical Microbiology June 2008; 46(6): 1961-1964.
- Grabsch EA, Ghaly-Derias S, Gao W *et al.* Comparative study of selective chromogenic (chromID VRE) and bile esculin agars for isolation and identification of vanB-containing vancomycin-resistant enterococci from feces and rectal swabs. J Clin Microbiol 2008 Dec; 46(12):4034-6. Epub 2008 Oct 1.
- Hancock REW. Peptide antibiotics. Lancet 1997; 349:418-422.
- Handwerger S, Pucci M, Volk K *et al.* The cytoplasmatic peptidoglycan precursor of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. J Bacteriol 1992; 174:5982-5984.
- Handwerger S, Raucher B, Altarac D *et al.* Nosocomial outbreak due to *E. faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. Clin Infect Dis 1993; 16:750-755.
- Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE *et al.* In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. The Journal of Infectious Diseases 1993; 167:1224-7.
- Holt J, Krieg N, Sneath P *et al.* (ed.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Co, 9<sup>th</sup> edition, Baltimore, 1994.
- Holt J, Krieg N, Sneath D *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th, Williams & Wilkins, 1993; p. 525-558.
- Horvat RT, Potter LM, Bartholomew WR. Clonal dissemination of vancomycin-resistant *Enterococci* and comparison of susceptibility testing methods. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30(4): 235-241.
- Huyke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multidrug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis 1998; 4: 239-249.
- Jordens JZ, Bates J, Griffiths D. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Antim Chemoter 1994; 34:515-528.
- Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15(5):308-320.
- Klare I, Heier H, Claus H *et al.* vanA-mediated high-level glycopeptide in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. FEMS Microbiology Letters 1995; 125:165-172.
- Knight RG, Shlaes DM. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Enterococcus hirae* and *Streptococcus durans* homology group II. International Journal of Systematic Bacteriology 1986; 36(1), 111 a 113.
- Knudtson LM, Hartman P. Routine procedures for isolation and identification of *Enterococci* and fecal *Streptococci*. Applied and Environmental Microbiology 1992; 58(9): 3027-3031.
- Kruse H, Rorvik LM. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus* spp. in poultry production [abstract] In: Program and Abstracts of the 96th General Meeting of



- the American society for Microbiology, New Orleans. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1996.
- Kusude R, Kawai K, Salati F *et al.* *Enterococcus serolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 41:406-409.
- Landman D, Quale JM, Oydna E *et al.* Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3):751-752.
- Leclerc R, Derlot E, Duval I *et al.* Plasmid mediated resistance to vancomycin and teichoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319:157-161.
- Lee JH, Burner KD, Fealey ME *et al.* Prosthetic valve endocarditis: clinicopathological correlates in 122 surgical specimens from 116 patients (1985-2004). *Cardiovasc Pathol* 2009 Nov 18.
- Leme IL. Avaliação do perfil de suscetibilidade a antibióticos em amostras de enterococos de origem aviária em São Paulo. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo, 1998.
- Leme IL, Ferreira AJP, Botino JA *et al.* Epidemiology of enterococci glycopeptide resistance in poultry isolate in Brazil. In: 98<sup>th</sup> General Meeting, Atlanta, Georgia, EUA. American Society for Microbiology (Abstract C-360, p. 191), 1998.
- Lorian V, Fernandes F. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18(10):678-679.
- Martinez JA, Ruthazer R, Hansjosten K *et al.* Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant Enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1905-1912.
- Martinez-Murcia AJ, Collins MD. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 80:69-74.
- Mcdonald LC, Kuehnert J, Tenover FC *et al.* Vancomycin-resistant Enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerging Infectious Diseases* EID V3N3, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 1997. *Microbiol Rev* 2000; 13: 513-522.
- Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis* 1983;147:751-757.
- Moellering Jr RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1173-1178.
- Mudd A. Is it time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents. *Lancet* 1996; 348:1454-55.
- Mudd A. Vancomycin resistance and avoparcin. *Lancet*, 1996; 347:1412 [Letter].
- Mundt JO. Enterococci and lactic acid streptococci. In: Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME *et al.* (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986; p. 1063-1066.
- Mundy LM, Sahm DE, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol Rev* 2000; 13(4): 513-522.
- Murray BE. Editorial response: what can we do about vancomycin-resistant Enterococci? *Clin Infect Diseases* 1995; 20:1134-6.
- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:46-65.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Approved standard M7-A3: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 3<sup>rd</sup> ed. Villanova, PA, 1993a.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Approved standard M2-A5: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5<sup>th</sup> ed. Villanova, PA, 1993b.
- Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1994; 38:1788-93.
- Nilsson O, Greko C, Top J *et al.* Spread without known selective pressure of a vancomycin-resistant clone of *Enterococcus faecium* among broilers. *JAC Advance Access published online on February 24, 2009. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* doi:10.1093/jac/dkp045.
- Noble WC, Virani Z, Cree RG. Cotransfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NTTC 12202 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 93:195-198.
- Ono S, Muratani T, Matsumoto T. Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2005;7:2954-2958.
- Ott M, Wirick H. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) and the role of the healthcare worker. *Can Oper Room Nurs J* 2008 Mar; 26(1):21-4, 26-29, 32.
- Palazzo ICV, Camargo LBC, Zanella RC *et al.* Evolution of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with vanA plasmids. *Fems Microbiology Letters* 2006; 258: 29-36.
- Panagea S, Chadwick PR. Heat tolerance of vancomycin resistant Enterococci *faecium*. *J Clin Pathol* 1996; 49(8):687-689.
- Patel R, Kerry E, Pipe E *et al.* Determination of 16S rRNA sequences of Enterococci and application to species identification of nonmotile Enterococcus gallinarum isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1998 Nov; 36(11): 3399-3407.
- Peltroche-Llacsahuanga H, Top J, Weber-Heynemann J *et al.* Comparison of two chromogenic media for selective isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2009 Dec; 47(12):4113-4116. Epub 2009 Oct 7.
- Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemoter* 1997; 41:2016-2018.
- Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 6<sup>th</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology 1995; p. 308-14.
- Popieniek PH, Pratt RF. A fluorescent ligand for binding studies with glycopeptide antibiotics of the vancomycin class. *Anal Biochem* 1987; 165:108-113.
- Rince A, Flahaut S, Auffray Y. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* 2000 Apr; 55(1-3) (10):87-91.
- Ruoff KL. Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:75-79.
- Sastry V, Brennan MM, Levy NF *et al.* Vancomycin-resistant Enterococci: an emerging pathogen in immunosuppressed transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 1995; 27(1): 954-955.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34:31-34.
- Sechi LA, Franklin R, Dupre I *et al.* Characterization of new insertion-like sequences of *Enterococcus hirae* and their dissemination among clinical *Enterococcus faecium* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 161(1):165-72.
- Shaw KJ, Hare RS, Sabatelli FJ *et al.* Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemoter* 1991; 35:2253-61.
- Shay DK, Goldmann D, Jarvis W. Reducing the spread of antimicrobial-resistant micro-organisms. *Control of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrobial Resistance In Pediatrics* 1995b; 42(3):703-716.
- Shay DK, Maloney SA, Banerjee S *et al.* Epidemiology and mortality risk of vancomycin resistant enterococcal bloodstream infections. *J Infect Dis* 1995a; 172:993-1000.
- Shekar R, Chico G, Bass SN *et al.* Household transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 1995; 21:1511-2.
- Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microb Infect* 2002. 4: 215-224.
- Shleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. As *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriology* 1984; 34:31-34.
- Smith T. The United States confirms isolates of *S. aureus* with diminished susceptibility to vancomycin. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/cause/april98.htm>. Atualizado em: 21/maio/98.
- Sng LH, Cornish N, Knapp CC *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of a clinical isolate of vancomycin-dependent enterococcus using D-alanine-D-alanine as a growth supplement. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(4):399-403.
- Stern CS, Carvalho MG, Teixeira LM. Characterization of Enterococci isolates from human and nonhuman sources in Brasil. *Diag Microbiol Infect Dis* 1994; 20:61-67.
- Stewart B, Hall L, Duke B *et al.* Vancomycin-dependent enterococci: curious phenomenon or serious threat? *J Antimicrob Chemoter* 1997; 40(5):734-735.
- Suppola JP, Volin L, Valtonen VV *et al.* Overgrowth of *Enterococcus faecium* in the feces of patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 1996; 23:694-697.
- Surcouf C, Fabre M, Enouf V *et al.* Glycopeptide-resistant enterococci carriage: Are actual isolation and identification techniques sufficient? *Pathol Biol (Paris)* 2009 May 26. [Epub ahead of print.]
- Swenson JM. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3019-3021.
- Tablan O, Tenover F, Martone W *et al.* Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). U.S. Department of Health and Human Services – Public Health Service, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 44:(No.RR-12): 1-13, 1995.



- Tailor SAN, Bailey E, Rybak MJ. Enterococcus, an emerging pathogen. The Annals of Pharmacotherapy 1993; 27:1231-1242.
- Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. Enterococcus. In: Patrick R, Murray *et al.* Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed, vol. 1. Washington, DC. ISBN-10:1-55581-371-2 (set), 2007.
- Teixeira L, Facklam R. *Enterococcus*. Symposium Update On Gram-Positive Cocci: Taxonomy, Identification And Clinical Significance. 98<sup>th</sup> General Meeting, American Society for Microbiology, Atlanta, GA, EUA, 1998.
- Tenover FC. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993; 31:1695-1699.
- Thal L, Chow JW, Clewell DB *et al.* Tn924, a cromosome-borde transposon encoding high-level gentamicin resistance in *E. faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother, 1994; 38:1152-1156.
- Thal L, Chow JW, Mahayni R *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in Enterococci of animal origin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995; 39(9):2112-2115.
- Thiercelin ME, Jouhaud L. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; graduations périphériques et microblastes. CRS Soc Biol Fil 1903; 55: 686-688.
- Thiercelin ME. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. CR Soc Biol 1899; 51:269-271.
- Traub WH, Leonhard B, Bauer D. *Enterococcus faecium*: *in vitro* activity of antimicrobial drugs, singly and combined, with and without defibrinated human blood, against multiple-antibiotic-resistant Strains. Chemotherapy 1993; 39:254-264.
- Turenne CY, Hoban DJ, Karlowsky JA *et al.* Screening of stool samples for identification of vancomycin-resistant Enterococcus isolates should include the methyl-alpha-D-glucopyranoside test to differentiate nonmotile Enterococcus gallinarum from Enterococcus faecium. J Clin Microbiol 1998; 36(8):2333-2335.
- Tyrrell GJ, Bethune RN, Willey B *et al.* Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. J Clin Microbiol, 1997 May; 35(5):1054-60. Erratum in: J Clin Microbiol 1997 Sep; 35(9): 2434.
- Weinstein MP, Mirrett S, Kannangara S *et al.* Multicenter evaluation of use of penicillin and ampicillin as surrogates for *in vitro* testing of susceptibility of enterococci to imipenem. J Clin Microbiol 2004; 8:3747-3751.
- Williams AM, Rodrigues U, Collins MD. Intragenic relationships of Enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. Res Microbiol 1991; 142:67-74.
- Woodford N, Adebisi AM, Papepou MF *et al.* Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(3):502-508.
- Yang Y, Lee D, Kim Y *et al.* Occurrence of the Van Genes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from clinical isolates in Korea. Pharmaceutical Society of Korea 2007 March; 30(3).
- Zanella RC, Lima MJC, Tegani LS *et al.* Emergence of vanB phenotype-vanA genotype in vancomycin-resistant enterococci in Brazilian hospital. Braz J Microbiol 2006; 37: 117-118.



# Capítulo 13

---

## Estafilococcias

*Ivani Lúcia Leme*

- Introdução, 171
- Infecções por estafilococos resistentes à meticilina, 171
- Taxonomia e descrição do gênero *Staphylococcus*, 172
- Resistência a antimicrobianos, 176
- Tendências sobre métodos laboratoriais de isolamento e identificação, 180
- Referências bibliográficas, 181



## ► Introdução

As infecções por estafilococos constituem um dos diagnósticos mais frequentes na clínica médica aplicada a seres humanos e animais em todo o mundo.<sup>1</sup>

Os estafilococos são bactérias amplamente disseminadas na natureza, capazes de sobreviver a extremos de temperatura, altas concentrações de sal e em ambientes secos. Podem penetrar o organismo através de cortes ou feridas, invadir a corrente sanguínea, o trato urinário, os pulmões ou o coração, causando infecções graves em pacientes crônicos, imunocomprometidos ou hospitalizados. Os indivíduos saudáveis também podem manifestar doenças estafilocócicas tais como as que acometem a pele e a endocardite. Os sintomas da infecção são variáveis e dependem da localização e da gravidade da doença. A mastite estafilocócica em caprinos e bovinos é grave para o animal e também para o rebanho, com impacto econômico na produção animal, pois pode afetar a produção de leite. Estima-se que aproximadamente um terço dos seres humanos sejam portadores assintomáticos de estafilococos nas mucosas nasais ou na pele, podendo ocorrer transmissão para outras pessoas (portador sã ou assintomático).

As infecções de pele causadas pelos estafilococos apresentam-se clinicamente como furúnculos, impetigo, celulites e síndrome da pele escaldada.

Furúnculos são infecções de pele bastante comuns que se desenvolvem nos folículos pilosos ou nas glândulas sebáceas e se localizam mais frequentemente nas axilas e nas nádegas. Inicialmente, a pele torna-se avermelhada e, depois, inchada. Ao se romper, o furúnculo pode drenar pus, sangue ou um líquido amarelado.

O impetigo é uma infecção extremamente contagiosa e dolorosa, espalhando-se na camada mais superficial da pele. Pode ocorrer em qualquer idade, mas afeta sobretudo crianças. O impetigo bolhoso produz bolhas grandes e frágeis, pode ser causado por *Staphylococcus aureus* e acomete crianças de todas as idades. Afeta frequentemente a face, mas pode aparecer em outros locais. As bolhas que se formam têm paredes muito finas e, quando rompem, deixam uma base vermelha viva, inflamada, úmida. O impetigo comum é causado por *Streptococcus* do grupo A e geralmente acomete crianças de 3 a 5 anos. A área infectada desenvolve pústulas que se rompem, deixando uma base avermelhada recoberta por uma crosta amarelada. Pele traumatizada, com cortes, picadas, machucados ou rachaduras, problemas crônicos de saúde, desnutrição ou higiene inadequada podem facilitar o desenvolvimento do impetigo também em adultos. O *Streptococcus* pode ainda ser transmitido por roupas contaminadas ou toalhas, assim como pelo contato direto com secreções das lesões. A transmissão da doença pessoa a pessoa pode ser evitada com higienização frequente das mãos, de roupas e de ambientes.

O diagnóstico laboratorial do impetigo é feito mediante cultura de pequenos fragmentos de pele. A cultura possibilita a identificação do microrganismo presente e também o teste de sensibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos. Embora benigno, o impetigo comum (por *Streptococcus*) eventualmente pode causar glomerulonefrite e, se não tratado, causar infecção disseminada. A antibioticoterapia inclui derivados de penicilina, eritromicina e cefalexina. Nos casos mais leves é recomendado tratamento com pomada à base de mupirocina.

As celulites por estafilococos também provocam inchaço e vermelhidão da pele, que se apresenta com aparência de casca de laranja, com depressões na região dos folículos capilares.

Ocorre geralmente na região das pernas e dos pés, principalmente em idosos.

A síndrome da pele escaldada afeta o recém-nascido, provocando febre, *rash* e bolhas. Ao se romperem, as bolhas deixam a superfície da pele enrugada e avermelhada, assemelhando-se a queimaduras.<sup>2</sup>

Os estafilococos também estão relacionados com doenças de transmissão alimentar. Alimentos contaminados podem causar síndromes de intoxicação alimentar, com início rápido dos sintomas, até 6 h após a ingestão. Os sintomas incluem: cólicas abdominais, náuseas, vômitos e diarreia. A doença é autolimitada, persistindo por 1 a 2 dias, mas os efeitos podem se tornar sérios em crianças e idosos.

A bacteriemia por estafilococos ocorre quando as bactérias invadem a corrente sanguínea. Febres persistentes podem significar bacteriemia. A bactéria pode disseminar-se para o sangue a partir de infecções profundas da pele, afetando outros órgãos internos como o coração (endocardite) e/ou pulmões (pneumonia).

A síndrome do choque tóxico relaciona-se com o uso de tampões higiênicos e, menos frequentemente, com feridas na pele e após cirurgias. Desenvolve-se subitamente com febre alta, náuseas e vômitos, *rash* nas palmas das mãos e na superfície plantar, semelhante a queimaduras solares. Confusão mental, dor muscular, tonturas e dor de cabeça também são sintomas relatados.

A artrite séptica geralmente é causada por estafilococos, afetando as articulações dos joelhos, cotovelos, pulsos, assim como quadris, ombros e clavícula. Os sintomas são inflamações ou inchaço nas articulações, dor grave na articulação afetada, febre, calafrios.

## ► Infecções por estafilococos resistentes à meticilina

A multirresistência a antibióticos nos *Staphylococcus aureus*, a exemplo do que ocorre em outras espécies bacterianas, é resultado de décadas de uso excessivo e inadequado de antibióticos. A resistência dessa cepa de *Staphylococcus aureus* a vários antibióticos e à meticilina compromete e dificulta o tratamento. As infecções da pele por *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) iniciam-se com pequenas manchas avermelhadas superficiais, semelhantes a picadas de aranha, bolhas ou pústulas. No entanto, essas lesões rapidamente se tornam profundas, formando abscessos dolorosos que requerem drenagem cirúrgica. A bactéria pode permanecer confinada à pele e penetrar o organismo pela corrente sanguínea, causando infecções potenciais em ossos, articulações, feridas cirúrgicas, válvulas cardíacas e pulmões.<sup>3</sup>

No final dos anos 1980 foram identificados os primeiros casos de resistência à vancomicina entre enterococos, associada aos genes *vanA* e *vanB*.<sup>4</sup> Em 1992, Noble *et al.* já demonstravam experimentalmente que era possível a transferência de genes *vanA* dos enterococos resistentes à vancomicina para *S. aureus*, sugerindo o potencial da bactéria em adquirir esses genes *in vivo*, produzindo resistência clínica à vancomicina.<sup>5</sup>

Até 1996, os MRSA eram suscetíveis à vancomicina, mas, como previsto, começaram a ser detectados os primeiros *S. aureus* com níveis reduzidos de resistência à vancomicina nos EUA e no Japão (concentração inibitória mínima [CIM]  $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), agravando o problema da emergência de resistência.<sup>6</sup>



Entretanto, essas amostras de *S. aureus* não eram totalmente resistentes à vancomicina, e permaneciam suscetíveis a outros antibióticos disponíveis, como as tetraciclina.<sup>7</sup>

O tratamento convencional das estafilococcias tomou novos rumos quando as cepas isoladas passaram a apresentar resistência também aos antimicrobianos de escolha para organismos gram-positivos, resultando em aumento de morbidade, mortalidade e prolongamento da internação dos pacientes. A terapia com vancomicina é de alto custo para os sistemas de saúde.

Atualmente, estudos de cepas multirresistentes de *S. aureus* indicam a possibilidade de desenvolvimento de resistência total à vancomicina, o que tornaria muitas das infecções estafilocócicas sem opção de tratamento com o atual arsenal terapêutico disponível. A resistência a todos os antibióticos, incluindo à vancomicina, uma vez instalada em nossos hospitais, poderá resultar em sérios problemas clínicos e graves consequências na saúde pública, pois não restará alternativa terapêutica disponível no tratamento de infecções por estafilococos panresistentes.<sup>8</sup>

Infecções por outras espécies de estafilococos, como *S. haemolyticus* (MRSH), *S. epidermidis* e estafilococos coagulase-negativos (ECN), com suscetibilidade reduzida à vancomicina, também estão descritas na literatura.<sup>9-11</sup>

As estafilococcias por MRSA podem ser fatais e o diagnóstico laboratorial é de extrema importância. Os MRSA ocorrem em hospitais ou em outros serviços de saúde, como centros de diálise e instituições de longa permanência (*health care-associated* MRSA [HA-MRSA]). Idosos, adultos e pessoas imunocomprometidas têm maior risco de adquirir infecções por HA-MRSA. Recentemente estão sendo observadas infecções por MRSA em pessoas saudáveis na comunidade em geral, com lesões na pele, infecções de tecidos moles e uma forma grave de pneumonia (*community-associated* MRSA [CA-MRSA]).<sup>12</sup>

Atualmente, o diagnóstico laboratorial das estafilococcias, além da identificação e antibiograma tradicionais, deve incluir a detecção de genes de resistência a antibióticos por técnicas moleculares. Fredheim *et al.* encontraram uma grande prevalência de genes associados à resistência a betalactâmicos e aminoglicosídeos, assim como a glicopeptídios e capacidade para formação de biofilmes.<sup>13</sup>

Neste capítulo serão abordados os aspectos taxonômicos do gênero *Staphylococcus*, a sintomatologia clínica das estafilococcias, os quadros atuais de identificação de gênero e espécie e os fenótipos mais frequentes de resistência a antibióticos.

## ► Taxonomia e descrição do gênero *Staphylococcus*

Os gêneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Planococcus* pertencem à família Micrococcaceae, que agrupa os cocos gram-positivos, catalase-positivos. Técnicas de hibridização de DNA-rRNA e comparativos entre os oligonucleotídeos de 16S rRNA indicam que o gênero *Staphylococcus* não é tão próximo dos *Micrococcus* como se supunha, e sim do novo gênero descrito como *Macrococcus*.<sup>14</sup>

*Staphylo* vem do grego *staphylé* – cachos de uvas. No exame microscópico, os membros do gênero *Staphylococcus* são células esféricas – cocos gram-positivos, de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, ocorrendo isolados, em pares, tétrades, cadeias curtas (3 ou 4 células). Em material patológico ou crescimentos em

meio sólido encontramos geralmente os agregados de estafilococos em forma de cachos, enquanto em meio líquido podem apresentar-se como cadeias curtas ou como agrupamentos irregulares característicos, semelhantes a cachos de uva. A divisão celular ocorre em planos perpendiculares sucessivos, sem que ocorra separação completa das células, resultando em agregados irregulares com o aspecto característico citado. Os estafilococos são anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, com metabolismo respiratório e fermentativo. As colônias geralmente são opacas, com coloração variável de branco ao creme e algumas vezes do amarelo ao laranja. São imóveis, não formam esporos, geralmente catalase-positivos e não capsulados. Em condições laboratoriais pode ocorrer formação de cápsula de maneira limitada. As espécies *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius* excepcionalmente produzem gás e após um crescimento inicial anaerobicamente, podem tornar-se aerotolerantes em subculturas. O Quadro 13.1 mostra as diferenças entre os principais gêneros de cocos gram-positivos.

Atualmente o gênero *Staphylococcus* conta com 41 espécies e 25 subespécies catalogadas (<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>).

As principais características de diferenciação entre espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus* são: diâmetro da colônia em mm (> 5,0 mm), pigmento carotenóide da colônia, crescimento aeróbico, crescimento anaeróbico em tioglicolato, crescimento em ágar contendo 10 e 15% de cloreto de sódio, crescimento a 15 e 45°C, teste de oxidase (detecção do citocromo c), produção de ácido láctico a partir de L(+)-isômeros e D(-)-isômeros, produção de acetoina, teste da aldolase (classes I e II), produção de ácido a partir de diversos substratos (D-xilose, L-arabinose, D-celubiose, D-fucose, rafinose, salicina, sacarose, maltose, D-manitol, D-manose, D-treose, α-lactose, D-galactose, β-D-frutose, D-melezitose, D-turanose, D-ribose, xilitol), presença da enzima hialuronidase, crescimento na presença de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (como fonte de nitrogênio), redução de nitrato, teste da fosfatase alcalina, da arginina desidrogenase, urease, coagulase (sangue de coelho), fator *cumpling*, fibrinolise, hemólise, produção de DNase, de nucleases estáveis ao calor, de β-glucosidase, β-glucuronidase, β-galactosidase e resistência à novobiocina (concentração inibitória mínima ≥ 1,6 µg/ml) e testes de catalase, coagulase, resistência à novobiocina, DNase, presença de proteína A e lise pela enzima lisostafina (Manual Bergey, 1995).

A presença de cápsula em algumas amostras de *S. aureus* pode ser observada pelo método da tinta da Índia, técnicas de microscopia eletrônica ou reação de *Quellung* com antissoro capsular específico. Aparentemente a presença de cápsula é mais frequente *in vivo* do que após cultivo *in vitro*, podendo estar relacionada com a virulência da cepa.<sup>15</sup>

A maioria das cepas de *S. aureus* produz um pigmento carotenóide amarelo-ouro característico em meio sólido, podendo ocorrer variações do branco ao alaranjado. As espécies de *S. epidermidis* geralmente são brancas e as de *S. saprophyticus* branco-acinzentadas. As colônias de estafilococos são bem definidas, arredondadas, convexas, com aproximadamente 4 mm de diâmetro.

As colônias de *S. aureus* em ágar-sangue apresentam-se rodeadas por um halo claro de beta-hemólise, cuja intensidade ou tipo de hemolisina liberada dependerá da cepa e da fonte de sangue utilizada. *S. saprophyticus* é não hemolítico, enquanto algumas cepas de *S. epidermidis* também podem apresentar beta-hemólise.<sup>15</sup>



Quadro 13.1 • Identificação de gêneros de cocos gram-positivos.<sup>a</sup>

Testes		Gêneros						
		<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Planococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
Conteúdo de G+C (% molecular) de DNA		30 a 39	38 a 45	34 a 42	34 a 46	35 a 40	39 a 52	66 a 75
Aeróbio estrito		–	±	–	–	–	+	+
Aeróbio facultativo ou microaerófilo		i	±	+	+	+	–	–
Anaeróbio estrito		–	–	–	i	–	–	–
Arranjo das células em tétrades		i	i	–	–	+	i	+
Forte aderência ao ágar		– <sup>#</sup>	–	–	–	–	–	–
Motilidade		–	–	i	–	–	+	–
Crescimento em:	Ágar 5% NaCl	+	+	+	i	+	+	+
	Ágar 6,5% NaCl	+	+	+	i	+	+	+
	Ágar 12% NaCl	i	±	±	–	+	+	i
	P ágar em 18 h*	+	i	±	–	–	–	–
	Ágar Schleifer-Kramer**	+	nd	±	–	nd	nd	–
Resultado da reação de catalase <sup>#</sup>		+	+	–	–	–	+	++
Resultado do teste de benzidina <sup>##</sup>		+	+	–	–	–	+	+
Resultado do teste de oxidase modificado		–	+	–	–	–	nd	–+
Produção anaeróbica de ácido a partir de glicose		i	–	+	+	+	–	i–
Produção aeróbica de ácido a partir de glicerol		+	i	i	i	nd	–	–
Resistência a:	Lisostafina (200 µg/ml)	–	–	+	+	+	+	+
	Eritromicina (0,4 µg/ml)	+	+	+	–	nd	nd	–
	Bacitracina (0,04 U) <sup>b</sup>	+	+	+	i	–	nd	–
	Furazolidona (100 µg/ml) <sup>c</sup>	–	–	–	–	–	–	+ <sup>†</sup>

<sup>a</sup>Símbolos e abreviações: + = 90% ou mais espécies ou cepas produzem reação positiva; – = 90% ou mais espécies ou cepas são negativas à reação; i = 11 a 89% de espécies ou cepas positivas; nd = não determinado.

<sup>b</sup>É usado um disco com antibiótico. Reações positivas indicam resistência e nenhuma zona de inibição. *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Aeromonas* spp. são suscetíveis e apresentam zona de inibição de 10 a 25 mm de diâmetro.

<sup>c</sup>Algumas cepas de *S. epidermidis* aderem fortemente à superfície do ágar, propriedade relacionada com a produção de biofilme (slime).

\*O crescimento em P ágar é realizado sob condições aeróbicas a 35 a 37°C.

\*\*Crescimento no ágar Schleifer-Kramer sob condições aeróbicas a 35 a 37°C por 24 a 48 h. Colônias com no mínimo 1 mm de diâmetro indicam crescimento positivo +. Colônias entre 0,5 e 1 mm de diâmetro use símbolo ±.

<sup>#</sup>Uma reação leve ou pseudocatalase pode ser observada em certas cepas de espécies designadas como catalase-negativas. Em algumas espécies a atividade da catalase pode ser ativada pela suplementação de hemina.

<sup>##</sup>Teste da benzidina detecta a presença de citocromos. Algumas cepas de espécies com teste negativo de benzidina podem sintetizar citocromos em meio suplementado com hemina, em aerobiose (Faller e Schleifer, 1981).

<sup>†</sup>Algumas cepas de *Micrococcus* demonstram altos níveis de resistência à eritromicina (CIM ≥ 50 µg/ml).

Fontes: Adaptação de Bannerman e Peacock, 2007;<sup>14</sup> Cowan e Steel, 1981;<sup>15</sup> Kloos e Lambe, 1991.<sup>16</sup>

*S. aureus* e *S. epidermidis* têm metabolismo anaeróbio facultativo, fermentando açúcares e produzindo grandes quantidades de ácido láctico. Os estafilococos têm enzimas respiratórias contendo o grupo heme, tais como os citocromos *a*, *b* e *o*, o qual contém grupos prostéticos ligados firmemente, capazes de doar ou receber elétrons assim como promover oxidação ou redução. A enzima catalase, em que o grupo heme também está presente, é responsável pela desintegração de peróxido de hidrogênio, prevenindo o acúmulo desse composto altamente tóxico para a bactéria.<sup>15</sup>

As espécies de estafilococos mais frequentes nas estafilococcias humanas são: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. articularis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii* e *S. xilosus*. As espécies que podem causar doenças em animais são: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* subsp. *hyicus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caprae* e *S. gallinarum*. Alguns primatas são colonizados por espécies de estafilococos que também são isoladas em humanos. Algumas espécies são de interesse industrial, como o *S. carnosus*, usado em processos de fermentação de carnes, no preparo de salames e salsichas. Pode-se isolar *S. caseolyticus* do leite e derivados.<sup>16</sup> A espécie *S. piscifermentans* foi isolada de peixe fermentado, na Tailândia.<sup>17</sup>

No diagnóstico laboratorial, utiliza-se a atividade da catalase para distinguir o gênero *Staphylococcus* do gênero *Streptococcus*, que são catalase-deficientes. No final dos anos

1950 foi introduzida a prova de fermentação de glicose para diferenciar entre *Micrococcus* e *Staphylococcus*, ambos os gêneros catalase-positivos. Os *Staphylococcus* fermentam glicose anaerobicamente, enquanto os *Micrococcus* oxidam o açúcar ou não o atacam. Os estafilococos fermentam manitol e crescem em concentrações de cloreto de sódio que são inibitórias para outros microrganismos, como, por exemplo, NaCl a 7,5%, capacidade utilizada na identificação das amostras. Apesar do crescimento em anarobiose, *S. aureus* e *S. epidermidis* crescem melhor aerobicamente, inclusive a presença de oxigênio é necessária para a produção de pigmento nas colônias.

O Quadro 13.1 mostra algumas características de diferenciação do gênero *Staphylococcus* de outros gêneros da família Micrococcaceae que também são catalase-positivos<sup>15</sup> e a diferenciação entre as espécies mais frequentes em nosso meio. As novas espécies introduzidas são: *S. condimentii*,<sup>18</sup> *S. lutrae*,<sup>19</sup> *S. muscae*,<sup>20</sup> *S. pasteurii*,<sup>21</sup> *S. succinus*,<sup>22</sup> *S. piscifermentans*<sup>17</sup> e *S. pulvereri*.<sup>23</sup>

Algumas características específicas, referentes à estrutura da célula bacteriana, são usadas nos métodos de tipagem molecular. Por exemplo, o peptidoglicano da parede celular das células estafilocócicas, que é caracterizado por pontes de pentaglicina que unem os tetrapeptídeos ligados a resíduos de ácido murâmico. Essas pontes de pentaglicina são suscetíveis à ação de enzimas como a lisostafina, que lisa *Staphylococcus*, mas não *Micrococcus*. Schleifer e Kloos (1975) determinaram



que o gênero *Staphylococcus* é sensível à lise por lisostafina, mas não à lisozima, característica que pode ajudar na separação de plasmídios de resistência a fármacos nas técnicas moleculares e também na diferenciação com outros gêneros.<sup>24</sup> A lisozima age na parede dos *Micrococcus*, mas não lisa *Staphylococcus*.<sup>15</sup>

As espécies atuais de *Staphylococcus* e seus códigos de referência das Coleções de Cultura a que pertencem estão descritas no Quadro 13.2. Consulte também, para atualização: [http://www.dsmz.de/micro-organisms/bacterial\\_nomenclature.php?](http://www.dsmz.de/micro-organisms/bacterial_nomenclature.php?)).

**Quadro 13.2 - Relação das espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus* (2009).**

Nº	Espécies	Cepa referência <sup>#</sup>	Ano de registro	Observações
	<i>Staphylococcus</i>	—	1884	Sinônimo: <i>Aurococcus</i>
1	<i>S. arlettae</i> <sup>a</sup>	BP47, DSM 20672	1985	Isolado de animal
2	<i>S. aureus</i> *	ATCC 12600	1884	Subespécie <i>anaerobius</i> ATCC 35844, DSM 20714, MVF-7 (1985) Subespécie <i>aureus</i> ATCC 12600, CCM 885, DSM 20231, NCTC 949, NCTC 8532
3	<i>S. auricularis</i>	ATCC 33753, DSM 20609, WK 811M	1983	Isolado do ouvido externo humano
4	<i>S. capitis</i>	ATCC 27840	1975	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> Sinônimo: <i>Staphylococcus capitis</i> ATCC 27840, CCM 2734, DSM 20326 Subespécie <i>urealyticus</i> ATCC 49326, DSM 6717, MAW 8436 (1992) Subespécie <i>ureolyticus</i> (1991)
5	<i>S. caprae</i> <sup>a</sup>	143.22, CCM 3573, DSM 20608	1998	Devriese <i>et al.</i> 1983 emend. Kawamura <i>et al.</i> , 1998
6	<i>S. carnosus</i> <sup>a</sup>	DSM 20501	1982	Subespécie <i>utilis</i> DSM 11676, SK 11 (1998)
7	<i>S. caseolyticus</i> <sup>a</sup>	ATCC 13548, DSM 20597	ex Evans 1916 atual 1982	Sinônimo: <i>Macrococcus casseolyticus</i> (1998)
8	<i>S. chromogenes</i> <sup>a</sup>	ATCC 43764, CCM 3387, DSM 20454, NCTC 10530	1978	Sinônimo: <i>Staphylococcus hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>
9	<i>S. cohnii</i>	ATCC 29974, CCM 2736, DSM 20260	1975	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> Subespécie <i>urealyticus</i> ATCC 49330, CK27, DSM 6718 (1991)
10	<i>S. condimenti</i>	DSM 11674	1998	Isolado de molho de soja Sinônimo: <i>Tetracoccus soyae</i> , Ueno e Omata, 1961
11	<i>S. delphini</i> <sup>a</sup>	DSM 20771	1988	Coagulase-positivo, isolado de golfinho
12	<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990, CCM 2124, DSM 20044	1908/1916	Isolado da pele humana
13	<i>S. equorum</i> <sup>a</sup>	DSM 20674, PA231	1985	Sinônimo: <i>equorum</i> subsp. <i>Equorum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i> novobiocina-resistente
14	<i>S. felis</i> *	ATCC 49168, DSM 7377, GD521, JCM 7469	1989	Isolado de gatos
15	<i>S. fleuretti</i>	241, CIP 106114, DSM 13212	2000	Isolado de queijo de cabra
16	<i>S. gallinarum</i> <sup>a</sup>	CCM 3572, DSM 20610	1983	Isolado de aves
17	<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970, CCM 2737, DSM 20263	1975	Isolado da pele humana
18	<i>S. hominis</i>	ATCC 27844, DSM 20328	1975	Sinônimo: <i>hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (1998) <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobioceticus</i> ATCC 700236 (1998)
19	<i>S. hyicus</i> * <sup>a</sup>	ATCC 11249	1953	<i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> NCTC 10530 (1978)
20	<i>S. intermedius</i> * <sup>a</sup>	ATCC 29663, CCM 5739, DSM 20373, NCTC 11048	1976	Isolado de animal
21	<i>S. kloosii</i> <sup>a</sup>	DSM 20676 SC 210	1985	Novobiocina-resistente
22	<i>S. lentus</i> <sup>a</sup>	ATCC 29070, DSM 20352	1976	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>
23	<i>S. lugdunensis</i>	ATCC 43809, DSM 4804, N 860297	1988	Isolado de amostra clínica humana
24	<i>S. lutrae</i>	DSM 10244, M340/94/1	1997	Isolado de lontras
25	<i>S. muscae</i>	CCM 4175, DSM 7068, MB4	1992	Isolado de moscas
26	<i>S. nepalensis</i>	CCM 7045, CW1, DSM 15150	2003	Isolado de cabras da região do Himalaia
27	<i>S. pasteurii</i>	ATCC 51129, BM9357, CCM 4389, DSM 10656	1993	Isolado de amostras humanas, animais e alimentos
28	<i>S. pettenkoferi</i>	B3117, CCUG 51270, CIP 107711	2007	Coagulase-negativo, isolado de amostra humana
29	<i>S. piscifermentans</i>	DSM 7373, JCM 6057, NRIC 1817, SK03, TISTR 824	1992	Isolado de peixe fermentado da Tailândia
30	<i>S. pseudintermedius</i>	CCUG 49543, LMG 22219, ON 86	2005	Coagulase-positivo, isolado de animais
31	<i>S. pulvereri</i>	DSM 9930, NT215, PCM 2443	1995	Sinônimo: <i>Staphylococcus vitulinus</i> Isolado de espécies animais e humanas
32	<i>S. saccharolyticus</i>	ATCC 14953, DSM 20359	1948/1984	Transferido do gênero <i>Peptococcus</i> (1981) Sinônimo: <i>Peptococcus saccharolyticus</i>
33	<i>S. saprophyticus</i>	CCM 4410, KV 12	1940	Subespécie <i>bovis</i> CCM 4410 (1996) <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i> ATCC 15305, CCM 883, DSM 20229, NCIB 8711, NCTC 7292 (1951)

Continua



**Quadro 13.2 - Relação das espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus* (2009) (continuação).**

Nº	Espécies	Cepa referência <sup>#</sup>	Ano de registro	Observações
34	<i>S. schleiferi</i>	ATCC 43808	1988	Isolado de amostras clínicas humanas Subespécie <i>coagulans</i> JCM 7470 (1990) <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>
35	<i>S. sciuri</i> <sup>a</sup>	ATCC 29062, DSM 20345	1976	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> ATCC 100058 (1997) <i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i> ATCC 29070 (1976) <i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> ATCC 700061 (1997) Sinônimo: <i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
36	<i>S. simiai</i>	CCM 7213, LMG 22723	2005	Isolado de macacos-prego sul-americanos
37	<i>S. simulans</i>	ATCC 27848, CCM 2705, DSM 20322	1975	Sinônimo: <i>Staphylococcus staphylolyticus</i>
38	<i>S. succinus</i>	AMG-D1, ATCC 700337, DSM 14617	1998	Isolado de âmbar dominicano <i>S. succinus</i> subsp. <i>Casei</i> (2003 – CIP 107658, DSM 15096, SB72) <i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i> (1998 – AMG-D1, ATCC 700337)
39	<i>S. vitulinus</i>	ATCC 51145, DD 756	1994, reclassificado em 2004	<i>Staphylococcus pulvereri</i> (heterotypic syn.), <i>Staphylococcus vitulus</i> (nome ortograficamente incorreto)
40	<i>S. warneri</i>	ATCC 27836, CCM 2730, DSM 20316	1975	Isolado da pele humana
41	<i>S. xylosus</i>	ATCC 29971, CCM 2738, DSM 20266	1975	Isolado da pele humana

\*Coagulase-positivos.

<sup>a</sup>Espécies não isoladas no ser humano.<sup>#</sup>DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemanha; ATCC = American Type Culture Collection, Corporate, EUA; CCM = Czechoslovak Collection of Micro-organisms, República Tcheca; NCTC = National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, Inglaterra, Reino Unido; JCM = Japan Collection of Micro-organisms, Japão; TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Tailândia; PCM = Polish Culture Collection of Micro-organisms, Wrocław, Polônia.Fontes: <http://www-sv.cict.fr>, [http://www.dsmz.de/micro-organisms/bacterial\\_nomenclature.php](http://www.dsmz.de/micro-organisms/bacterial_nomenclature.php)

Os produtos celulares e extracelulares dos *S. aureus* incluem antígenos capsulares, proteína A, coagulases (livre e ligada), hemolisinas, leucocidina, enterotoxinas, toxinas epidermolíticas e a *toxina da síndrome do choque tóxico*. Os antígenos espécie-específicos dos estafilococos são os ácidos teicoicos de parede celular. Como determinante antigênico, ligado ao ribitol no *S. aureus*, encontra-se o ácido ribitol-teicoico, ligado à glicosamina por meio de ligação glicosídica alfa ou beta, ou ambas. O determinante antigênico do *S. epidermidis* é um esqueleto de glicerol fosfato ao qual se ligam os resíduos de glicose por meio de ligações glicosídicas alfa ou beta, formando o ácido glicerol-teicoico. Em determinações imunoquímicas das espécies de estafilococos utilizam-se anticorpos específicos contra essas estruturas.<sup>25,26</sup>

Os estafilococos têm a capacidade de aglutinar plasma (coagulase-positivos e coagulase-negativos) e este é o critério melhor aceito e mais amplamente utilizado nos laboratórios para identificação das espécies de estafilococos patogênicos em humanos e animais.

Há dois tipos de teste para detecção de coagulase: o teste em tubo, para detecção da enzima chamada de coagulase livre, e o teste em lâmina, um teste bastante rápido usado para seleção de cepas, onde se detecta a coagulase ligada ou *coupling factor*.<sup>27</sup> Pode-se utilizar vários tipos de plasmas, com exceção do plasma humano, que também tem fatores de inibição e de agregação. Há plasmas de coelho disponíveis comercialmente, liofilizados, contendo citrato ou EDTA, a maioria satisfatória. Economicamente, o teste em lâmina é mais barato do que o teste em tubo, porém 10 a 15% das cepas de *S. aureus* (coagulase-positivas) podem apresentar resultados falso-negativos, devendo ser reexaminadas com o teste em tubo. As espécies *S. hyicus* (coagulase-variáveis) e *S. intermedius* (coagulase-positivas) são de particular importância em medicina veterinária.<sup>28</sup>

Antes considerados como contaminantes, atualmente os estafilococos coagulase-negativos também são identificados nos laboratórios de microbiologia clínica por meio de identificação rápida da espécie por métodos automatizados, uma vez que algumas espécies estão sendo reconhecidas como importantes patógenos oportunistas em infecções hospitalares e frequentemente isolados em hemocultura.

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN), após colonização da pele ou mucosas, em especial *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, podem aderir e proliferar em determinados materiais biossintéticos (polímeros plásticos usados na confecção de cateteres etc.), causando infecções locais ou sistêmicas. Uma vez aderida, a bactéria passa a produzir uma substância polissacarídica extracelular viscosa – o *slime* – que a envolve completamente.

Investigando a patogenia das infecções causadas por ECN, Pfaller e Herwaldt (1988) concluíram que a produção de *slime* é um fator de virulência importante na colonização e desenvolvimento de infecções em próteses e dispositivos intravasculares, válvulas prostéticas, marca-passos, artroplastias, cateteres intravenosos, derivações intravenosas ou do líquido cerebrospinal, próteses vasculares, próteses articulares, cateteres de hemodiálise ou diálise peritoneal ambulatorial contínua.<sup>29</sup> O *S. saprophyticus* também é reconhecido como agente etiológico importante em infecções urinárias em mulheres jovens e sexualmente ativas.

A caracterização dos estafilococos coagulase-negativos e sua potencial patogenicidade é realizada de acordo com o seu biotipo – por meio de sistemas comerciais como API® Staph-Ident System, API® Staph-Trac, Minitex® Sceptor® Gram-positive MIC/ID, Vitek® Gram-positive, Microscan®, entre outros. Outros testes que podem ser utilizados: resistência a antimicrobianos e antissépticos, perfis plasmidiais e/ou cromossômicos, produção de *slime*, propriedades de aderência a plásticos e polímeros similares e suscetibilidade à fagocitose.



## ► Resistência a antimicrobianos

A capacidade adaptativa dos estafilococos aos antibióticos resultou na emergência de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) a partir dos anos 1960. Em 1975, foi isolada na Austrália uma cepa particular de *S. aureus*, epidêmica e resistente à meticilina (EMRSA-1), diferente de outras cepas resistentes à meticilina que não necessariamente causavam problemas epidêmicos ou endêmicos. Constatou-se que essa cepa era geneticamente diferente das amostras anteriores denominadas “clássicas”, e foi chamada de EMRSA (“*epidemic methicillin-resistant S. aureus* – MRSA”). Foi demonstrado que essa amostra apresentava características distintas de padrão de fagotipagem, perfil plasmidial, análise do DNA cromossômico e comportamento epidemiológico diferenciado.<sup>30</sup>

As amostras de *S. aureus* multirresistentes alteram o espectro de patogenicidade e morbidade das estafilococcias, levando à possibilidade de infecção hospitalar com consequências nunca antes imaginadas. A possibilidade da cepa MRSA colonizar pacientes e profissionais de saúde, tornando-os os principais reservatórios dentro do hospital, ao lado dos pacientes infectados, mostra a importância de seu acompanhamento criterioso quando detectadas. Essas amostras constituem um problema particular pelo fato de serem facilmente transmitidas de pessoa a pessoa, podendo ser carregadas de maneira assintomática.<sup>31</sup>

O diagnóstico laboratorial e controle de cepas multirresistentes passou a ser crucial nos hospitais. A identificação e a notificação do tipo de resistência seguem normas internacionais, pois sua permanência no ambiente institucional pode ocasionar surtos. O Quadro 13.3 apresenta as normas europeias.<sup>32</sup>

**Quadro 13.3 - Regras de interpretação de resultados de testes de sensibilidade a antimicrobianos para *Staphylococcus* spp.**

Organismo	Agente	Regra	Exceção	Base científica	Grau de evidência	Referências bibliográficas
<b>Betalactâmicos</b>						
<i>Staphylococcus</i> spp.	Isoxazolil-penicilina	Se resistente ao isoxazolil-penicilina (determinada com oxacilina, cefoxitina ou por detecção do gene <i>mecA</i> ou PBP2a), identificar como resistente a todos os betalactâmicos	Cefalosporinas anti-MRSA em desenvolvimento (p. ex., ceftobiprol e ceftaroline)	Produção de PBP2a (codificadas pelo gene <i>mecA</i> ) leva à resistência cruzada a betalactâmicos, exceto ceftobiprol e ceftaroline	A	33,34
<b>Aminoglicosídeos</b>						
<i>Staphylococcus</i> spp.	Canamicina	Se resistente à canamicina, foi perdido o sinergismo de canamicina e ampicilina com betalactâmicos. Identificar como resistente a canamicina e ampicilina	—	A resistência à canamicina se deve geralmente à produção de enzimas do tipo APH(3')I-3, ANT(4')(4'')-I ou APH(2')-AAC(6) bifuncional que determinam a perda de sinergismo da canamicina com betalactâmicos e glicopeptídeos, independentemente do valor de CIM	C	35,36
<i>Staphylococcus</i> spp.	Tobramicina	Se resistente à tobramicina, foi perdido o sinergismo da canamicina, tobramicina e ampicilina com betalactâmicos ou glicopeptídeos. Identifique como resistente a canamicina, tobramicina e ampicilina	—	A resistência à tobramicina é geralmente devida à produção de enzimas ANT(4')(4'')I ou bifuncional APH(2')-AAC(6) que determinam a perda de sinergismo a canamicina, tobramicina e ampicilina com betalactâmicos e glicopeptídeos, independentemente do valor de CIM	C	37
<i>Staphylococcus</i> spp.	Gentamicina	Se resistente à gentamicina, foi perdido o sinergismo a todos os aminoglicosídeos com $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos. Identifique como resistente para todos os aminoglicosídeos	Estreptomicina	Resistência à gentamicina se deve geralmente à produção de enzima bifuncional APH(2')-AAC(6), que determina a perda de sinergismo com aminoglicosídeos (exceto estreptomicina) com betalactâmicos e glicopeptídeos, independentemente do valor de CIM	B	38,39
<b>Quinolonas</b>						
<i>Staphylococcus</i> spp.	Ofloxacina Ciprofloxacina	Se resistente a ofloxacina ou ciprofloxacina, mas não a moxifloxacina ou levofloxacina, identificar com alerta: aquisição de uma primeira mutação pode levar ao desenvolvimento de resistência durante a terapia com outras quinolonas	—	Aquisição de pelo menos uma mutação-alvo em <i>grrA</i>	C	40,41
<i>Staphylococcus</i> spp.	Levofloxacina ou moxifloxacina	Se resistente a levofloxacina ou moxifloxacina, identificar como resistente a todas as fluorquinolonas	—	—	C	42,43

Continua



**Quadro 13.3 - Regras de interpretação de resultados de testes de sensibilidade a antimicrobianos para *Staphylococcus* spp (continuação).**

Organismo	Agente	Regra	Exceção	Base científica	Grau de evidência	Referências bibliográficas
<b>Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas</b>						
Todos	Eritromicina é a classe representativa para 14- e 15-macrolídeos agrupados pelos anéis	—	—	Resistência à eritromicina é geralmente devida à produção de metilase ribossomal codificada por genes <i>erm</i> , conferindo o fenótipo macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLSB) ou pela produção de uma bomba de efluxo. Em ambos os casos, há resistência cruzada entre eritromicina e outros macrolídeos com anel em 14- e 15-	C	44
<i>Staphylococcus</i> spp.	—	Se resistente à eritromicina, mas suscetível a clindamicina ou lincomicina, testar para resistência induzível MLSB. Se negativa, relatar como suscetível à clindamicina e à lincomicina. Se positivo, ou relatar como resistente à clindamicina e à lincomicina ou relatar como suscetível, com um aviso: “Pode ocorrer falência clínica durante tratamento com clindamicina ou lincosamina por seleção de mutantes resistentes constitucionais.” É provavelmente melhor evitar o uso de clindamicina/lincomicina em infecções graves	—	Estafilococos resistentes a macrolídeos, mas suscetíveis a lincosaminas (clindamicina e lincosamina) produzem metilases ribossômicas <i>Erm</i> , conferindo o fenótipo MLSB-induzível ou expressando resistência MLSB efluxo-induzível; mutantes resistentes constitucionais podem ser selecionados por lincosaminas. No caso de resistência por efluxo, o risco para seleção de mutantes resistentes a lincosaminas não é maior que aqueles isolados eritromicina-suscetíveis. Tanto a falência como o sucesso clínico com clindamicina devem ser documentados para estafilococos com resistência MLSB-induzível. Por um teste de difusão em disco, o fenótipo MLSB-induzível pode ser identificado por um achatamento da zona de clindamicina próxima ao disco de eritromicina	B	44,45
<i>Staphylococcus</i> spp.	Quinupristina-dalfopristina	Se resistente à clindamicina, alertar sobre o perigo de a atividade bactericida da quinupristina-dalfopristina estar reduzida	—	Resistência à clindamicina (associada à resistência à eritromicina) é um marcador do fenótipo de resistência B macrolídeo-lincosamida-estreptogramina constitutiva (MLSB). Resistência cruzada com o fator da estreptogramina do tipo B leva à diminuição da atividade bactericida da combinação de quinupristina e dalfopristina. Modelos experimentais de endocardite estafilocócica mostraram resultados contraditórios sobre a atividade <i>in vivo</i> da quinupristina-dalfopristina para o tratamento de animais infectados com isolados resistentes constitutivos MLSB	C	46,47,48

Membros macrolídeos 14- e 15- = azitromicina, claritromicina, diritromicina, eroxitromicina; aminoglicosídeos = amicacina, gentamicina, canamicina, netilmicina e tobramicina; ESBL = betalactamase de espectro estendido; glicopeptídeos = vancomicina e teicoplanina; isoxazolil-penicilinas = cloxacilina, flucloxacilina, dicloxacilina, metilicina, oxacilina, nafcilina; lincosamidas = clindamicina, lincomicina; macrolídeos = eritromicina, roxitromicina, claritromicina, diritromicina, azitromicina, espiramicina, josamicina; MLSB = fenótipo macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B; MRSA = *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente; oximino-cefalosporinas = cefepima, cefotaxima, cefpiroma, cefpodoxima, ceftazidima ou ceftioxone; estreptograminas = pristinamicina, quinupristina-dalfopristina; ureidopenicilinas = azlocilina, mezlocilina, piperacilina.

Resistência intrínseca = a resistência intrínseca é inerente (não adquirida). É uma característica de todos ou de quase todos os representantes das espécies. A atividade antimicrobiana da substância é insuficiente ou a resistência antimicrobiana é inata ou tão comum que torna os testes de suscetibilidade antimicrobiana clinicamente desnecessários. Resultados “suscetíveis” devem ser vistos com cuidado, pois eles provavelmente indicam erro na identificação ou nos testes de sensibilidade. Mesmo se a suscetibilidade é confirmada, o medicamento deverá ser usado com cautela. Em alguns casos, a resistência intrínseca a um antibiótico pode ser expressa em um nível baixo, com MIC perto do *breakpoint* de suscetibilidade, embora o antibiótico não seja considerado clinicamente ativo. As demais situações em que o antibiótico aparece totalmente ativo *in vitro*, mas inativo *in vivo* geralmente não são mencionadas nos quadros, uma vez que prevalecem as recomendações terapêuticas.

Fenótipos excepcionais de resistência = resistência de alguma espécie bacteriana a agentes antimicrobianos em particular que ainda não foram documentadas ou ainda são muito raros. Fenótipos excepcionais de resistência devem ser confirmados, pois podem indicar erros na identificação ou no teste de suscetibilidade. Se forem confirmados localmente, o isolado deverá ser encaminhado para um laboratório de referência para confirmação independente. Fenótipos excepcionais de resistência podem mudar, assim como a resistência pode se desenvolver e aumentar com o tempo. Há a possibilidade de também ser uma diferença regional ou nacional, enquanto uma resistência muito rara em uma área pode ser mais comum em outra.

Adaptado de EUCAST.<sup>32</sup>



A resistência a antimicrobianos no *S. aureus* é codificada cromossomicamente ou por plasmídeo. O *S. aureus* tem mecanismos distintos de resistência à meticilina:

- Hiperprodução de betalactamases
- Presença de uma proteína ligante de penicilina (*penicillin-binding protein* – PBP) adicional (PBP 2a ou PBP 2')
- Modificações na capacidade de ligação das PBP normais.<sup>49</sup>

Os antibióticos betalactâmicos são conhecidos por ligarem-se às PBP, com função na síntese do peptidoglicano. Atualmente são descritas cinco proteínas ligantes de penicilina que têm sido identificadas em cepas de *S. aureus* suscetíveis. É importante para o efeito antibacteriano que o antibiótico betalactâmico ligue-se à PBP 2. A presença de betalactamases, enzimas extracelulares que hidrolisam o anel betalactâmico, o principal mecanismo de resistência de amostras de *S. aureus* à penicilina G, é mediada por plasmídios.

As PBP são enzimas que catalisam a etapa terminal da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) por antibióticos betalactâmicos, unindo-se a eles por meio de ligações covalentes. A resistência intrínseca do MRSA é, em grande parte, devida à presença da PBP 2a ou 2', adicional, anormal, com baixa afinidade pelos antibióticos betalactâmicos. Esta proteína anormal é dependente de um gene cromossômico denominado *mec*, o qual constitui parte de um segmento de DNA de 35 KB, designado segmento *mec*-associado.<sup>49-51</sup>

Sabe-se que há ainda um segundo gene relacionado com a expressão de resistência à meticilina, chamado *fem A* (*factor essential for methicillin resistance*), cujo mecanismo é desconhecido.<sup>50</sup> A estabilidade e a dificuldade de transferência do gene *mec*, assim como a existência de outros fatores cromossômicos, como o determinante *fem A*, conferem um suporte para a origem clonal de amostras MRSA.<sup>52</sup> O espalhamento de clones de *S. aureus* carreando o gene *mec* (PBP 2a) ou a transferência horizontal do gene por si mesmo tem ocasionado o espalhamento mundial de amostras resistentes.<sup>53</sup>

A resistência à meticilina e a todos os outros antibióticos betalactâmicos é causada pela presença do gene *mecA*, que está situado em uma ilha genômica móvel, o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec). São conhecidos atualmente sete principais tipos de SCCmec, I a VII. A presença do gene *mec* indica amostras MRSA. Sua detecção propicia um método eficaz e acurado para identificar as amostras resistentes à meticilina independentemente de condições ambientais que possam afetar a expressão fenotípica de resistência,<sup>54</sup> podendo, portanto, ser usado como ferramenta diagnóstica quando outros testes de rotina falharem na elucidação do perfil da amostra.<sup>55</sup>

A princípio pensava-se que os clones de MRSA eram associados ao ambiente hospitalar (*hospital-associated* [HA-MRSA]), entretanto, a partir dos anos 1990, também emergiram cepas multirresistentes provenientes da comunidade (*community-associated* MRSA [CA-MRSA]).<sup>56</sup> As CA-MRSA carregam SCCmec tipo IV, V ou VII e essa característica tem sido usada na distinção de cepas HA-MRSA e é geralmente associada à produção de uma toxina – leucocidina Pantón-Valentine (PVL).<sup>57</sup>

Os métodos mais importantes para estudar a epidemiologia dos estafilococos multirresistentes – para genotipagem, incluindo o perfil plasmidial e análise de DNA cromossômico – são a eletroforese em gel de campo variado (*pulsed-field gel electrophoresis* [PFGE]), a tipagem de sequências *multilocus* (*multilocus sequence typing* [MLST]), a tipagem *spa* e a tipa-

gem de SCCmec. Estes métodos também são úteis para estudos da evolução clonal de cepas multirresistentes e seu espalhamento mundial desde 1960.<sup>58</sup> Ao contrário das técnicas convencionais, muitas dessas técnicas podem ser aplicadas a uma grande variedade de patógenos hospitalares sem mudanças significativas em equipamentos, reagentes ou protocolos e oferecem diferenciação das cepas no nível de genoma.<sup>29</sup>

A análise de plasmídios foi a primeira das técnicas a ser utilizada para a tipagem de *S. aureus*.<sup>59</sup> Essa técnica é fundamentada no fato de que as cepas podem apresentar plasmídios em número e peso molecular diferentes. Os resultados dessa técnica para tipagem de *S. aureus* são bastante significativos, com perfis claramente definidos, com plasmídios numerosos e de diferentes tamanhos.<sup>60,61</sup> Muitos plasmídios estão relacionados com resistência a antimicrobianos, podendo ocorrer ganho ou perda de plasmídios durante um surto de infecção hospitalar por *S. aureus*.<sup>61</sup>

A análise de DNA cromossômico por meio de PFGE baseia-se no fato de que o cromossomo bacteriano pode conter regiões mais variáveis e regiões mais conservadas. Apesar de mutações e rearranjos poderem acontecer em qualquer região do cromossomo com frequências semelhantes, aquelas que ocorrem em regiões mais conservadas tendem a ser fatais para a bactéria e, dessa maneira, não são transmitidas para outras gerações.<sup>62</sup> Portanto, mutações e rearranjos na sequência de nucleotídeos das regiões variáveis serão refletidas no padrão de fragmentos gerados após digestão do cromossomo com enzimas de restrição, e, subsequentemente, eletroforese em gel de agarose. Por outro lado, a eletroforese por meio da técnica de PFGE torna possível a resolução de fragmentos de DNA de alto peso molecular, possibilitando o uso de enzimas que reconhecem sequências longas de nucleotídeos e cortam o cromossomo em um número pequeno de fragmentos de alto peso molecular.<sup>63</sup> A combinação desses fatores leva à formação de padrões eletroforéticos de fácil análise e comparação.

O Laboratório de Microbiologia do Centro de Referência de Estafilococos da França usa análise de PCR (*polimerase chain reaction*) de espaço intragênico de rDNA 16S-23S, uma região do DNA com polimorfismos que pode ser usada como ferramenta molecular para separação de espécies. Mendonza *et al.* (1998) investigaram essa região de polimorfismo em cerca de 221 amostras de estafilococos pertencentes a 31 espécies usando o novo método de PCR.<sup>64</sup> Cada espécie apresentou um padrão específico 16S-23S composto de 1 a 8 fragmentos que variam de 104 a 771 pares de bases, com a exceção das espécies *S. warnei*, *Staphylococcus caprae* e *Staphylococcus piscifermentans*, que apresentaram fragmentos maiores ou menores. Outra espécie, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, mostrou mais de um padrão, enquanto a espécie *Staphylococcus aureus* foi a que se mostrou mais heterogênea (cinco padrões diferentes para oito cepas). Cinco amostras clínicas que não puderam ser identificadas em nível de espécie por meio de testes clássicos de fenotipagem foram finalmente identificadas por essa nova PCR. Discriminação entre espécies intimamente relacionadas (*Staphylococcus aureus*/*Staphylococcus chromogenes*/*Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus aureus*/*Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*/*Staphylococcus felis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus delphini*/*Staphylococcus felis*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus auricularis*) foi identificada após digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição, como *DraI*. Embora o método não torne possível discriminação de subespécies, o uso de informações da região 16S-23S determinado por amplificação por PCR foi satisfa-



tório para a identificação das 31 espécies de *Staphylococcus* examinadas nesse estudo. O método é rápido, fácil e pode ser uma ferramenta útil para a identificação de espécie de *Staphylococcus* no laboratório de microbiologia clínica de rotina.<sup>64</sup>

Outro método que utiliza uma variação do método de PCR conhecido como AFLP baseia-se em moldes de DNA, gerando padrões de bandas altamente complexos que podem ser usados em análises comparativas no contexto epidemiológico. Sloos *et al.* (1998) aplicaram o método de AFLP-PCR na avaliação de amostras de *Staphylococcus epidermidis*, isoladas da hemocultura de pacientes com septicemia. O método mostrou-se capaz de alto poder discriminatório entre as 44 amostras isoladas de 11 pacientes.<sup>65</sup>

Métodos de PCR também podem ser usados para a identificação mais sensível e específica dos genes das enterotoxinas B e C e de TSST-1 (toxina responsável pela síndrome do choque tóxico).

Schmitz *et al.* (1998) compararam a técnica combinada de PCR-multiplex com a aglutinação passiva reversa em látex para detectar produção de toxinas em colônias recolhidas da superfície de placas de ágar e usadas diretamente no ensaio de PCR, sem nenhuma preparação. Esse procedimento gerou informações sobre os genes *seb*, *sec-1* e *tst* em 4 h, com um único teste. Para avaliar a sensibilidade do método, os autores testaram 100 MRSA e 50 estafilococos coagulase-negativos, entre outras bactérias. A técnica de aglutinação passiva reversa foi usada como padrão-ouro. Pelo método de PCR-multiplex encontrou-se 100% de sensibilidade e especificidade na detecção dos *primers* *seb* e *tst*, enquanto a sensibilidade e especificidade do *primer* *sec-1* foi de 100 e 82%, respectivamente. Com o *primer* *sec-1*, dois isolados foram identificados como carreadores do gene correspondente de toxina, enquanto pelo método de aglutinação passiva reversa não foi possível detectar toxina. O método de PCR-multiplex gerou informações consistentes a respeito da capacidade de cepas estafilocóccicas produtoras de toxinas, podendo ainda ser usado em breve para detecção de genes *mecA*.<sup>66</sup>

Métodos moleculares com base no sequenciamento, como a tipagem de *spa* (por *polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP), têm facilitado a tipagem epidemiológica de isolados bacterianos comparados ao padrão-ouro que é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Melin *et al.* (2009) discutem a genotipagem de *spa* em relação à tipagem por bacteriófagos para discriminar cepas.<sup>67</sup>

A técnica de PFGE de DNA cromossômico requer mais trabalho, tempo e equipamentos mais caros, quando comparada com a análise de plasmídios. Porém, tem poder discriminatório mais elevado e pode ser utilizada para a tipagem de amostras que não apresentem plasmídios.<sup>61</sup>

Os testes sorológicos e a tipagem sérica bastante estudados nas décadas de 1960 e 1970, inicialmente em países escandinavos, necessitam de padronização para uso mais amplo. A demonstração de anticorpos por meio dessas técnicas seria eficaz na distinção de pacientes com bacteriemia estafilocócica não complicada daqueles pacientes com bacteriemia estafilocócica que desenvolveram endocardite ou doença metastática, requerendo uma terapia mais prolongada. A detecção de anticorpos antiácido teicoico pode ser útil no diagnóstico de endocardites, principalmente quando as culturas são negativas devido ao tratamento antibiótico prévio.<sup>68</sup> Existem alguns *kits* comerciais no mercado para detecção de anticorpos antiácido ribitol teicoico por meio de imunodifusão, contraímuno-eletroforese ou radioimunoensaio, entretanto tais testes são

indicados em situações clínicas específicas, principalmente de endocardite bacteriana e outras infecções profundas por *S. aureus*, limitando seu uso rotineiro em laboratórios clínicos.

Dados sobre fagotipagem e perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos também são utilizados na detecção da fonte de infecção em surtos epidêmicos de intoxicação alimentar e infecção hospitalar por *S. aureus*, juntamente com testes bioquímicos e sorológicos, que enfocam a epidemiologia da doença, indicando se foi adquirida no ambiente hospitalar ou na comunidade.

A fagotipagem para caracterização de estafilococos coagulase-positivos atualmente é considerada uma técnica subjetiva,<sup>69</sup> com percentual alto de cepas não tipáveis. Os resultados obtidos podem não apresentar boa reprodutibilidade e as amostras a serem comparadas devem ser testadas simultaneamente, mas essa técnica já foi bastante utilizada. Os fagos são padronizados pelo International Subcommittee for Phage typing of *S. aureus* com base na suscetibilidade do *S. aureus* a fagos líticos, em uma diluição de rotina de 100×. É recomendado o uso de no mínimo 23 fagos básicos de estafilococos. As reações padrão representam a suscetibilidade da cepa a várias combinações de fagotipagens e são divididas nos seguintes grupos: Grupo I, 29, 52, 52A, 79, 80; Grupo II, 3A, 3C, 55, 71; Grupo III, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85; e não agrupado 81, 94, 95, 96 (miscelânea). Os resultados são interpretados usando o critério de diferenciação de cepas, se elas mostram uma diferença de duas reações fortes. Esse método apresentou bons resultados na tipagem de amostras de *S. aureus* oxacilina-sensíveis, porém alguns autores relatam alta porcentagem de amostras de *S. aureus* oxacilina-resistentes como não tipáveis (nenhum fago do *set* básico é capaz de lisar certas amostras).<sup>29,61,70</sup> As cepas do grupo II geralmente são isoladas da comunidade, em contraste com as cepas dos grupos I e III, que prevalecem em infecções adquiridas no ambiente hospitalar. A fagotipagem para *S. epidermidis* ainda não está disponível para uso geral e as cepas são identificadas por meio de seus padrões de resistência a antimicrobianos ou biotipos (propriedades bioquímicas e metabólicas).

Para aumentar a detecção de amostras de MRSA são adotadas algumas variações de testes *in vitro*, tais como aumento de osmolaridade do meio de cultura (adicionando-se NaCl, inóculo mais pesado), diminuição da temperatura de incubação (30°C) e aumento do tempo de incubação.<sup>71-73</sup>

## ■ Técnicas para determinar o perfil de resistência a antimicrobianos

A detecção de resistência à oxacilina (metecilina), entre outros antibióticos, em *S. aureus* pode ser realizada por meio de métodos tradicionais como a difusão em disco – resultados não quantitativos, ou por meio de microdiluição em placa, diluição em ágar ou mesmo por meio de equipamentos de diferentes graus de automação que fornecem o valor da concentração inibitória mínima (CIM).

O E-test® (AB Biodisk, Estocolmo, Suécia) produz bons resultados e é de fácil realização: uma fita estreita de material plástico contendo um gradiente com concentrações crescentes de antibiótico é colocada em um ágar de Miller-Hinton de maneira semelhante ao teste de difusão em disco. A principal vantagem da fita é que ela fornece o valor de CIM diretamente e é inóculo-independente, o que a torna potencialmente útil, uma vez que a maior dificuldade das técnicas tradicionais quantitativas é a sua padronização, principalmente o inóculo



a ser usado no teste. A CIM é dada pela interseção da zona de crescimento bacteriano com a fita, em que uma escala numérica indica a concentração de antibiótico naquela região. Já existem fitas com a maioria dos antibióticos disponíveis no mercado. Limitação: as fitas ainda têm um custo muito alto para a maioria dos laboratórios, devendo seu uso ser reservado para casos especiais.<sup>74</sup>

O perfil de resistência das bactérias gram-positivas e alguns fenótipos excepcionais de resistência são descritos nos Quadros 13.4 e 13.5.

A interpretação atual de resultados de testes de suscetibilidade para *Staphylococcus* sp. é apresentada no Quadro 13.4, no qual devem-se observar algumas regras interpretativas. Com base na resistência a agentes antimicrobianos especiais e na identificação de um isolado é possível inferir o mecanismo de resistência e prever a resistência a outros agentes.

A aplicabilidade dessas regras é limitada pelo número de agentes testados, então, laboratórios individualmente podem precisar escolher que agentes testar para suas necessidades locais. Entretanto, é necessário reconhecer que a evidência de uma significância clínica das normas interpretativas variam e nesses quadros a evidência para a regra foi baseada em *graus de evidência*, a saber:

- Há evidência clínica que relata o resultado do teste como suscetível, mas leva à falência clínica
- Evidência é fraca e baseada somente em poucos casos relatados ou em modelos experimentais. É presumível que relatando o teste como suscetível pode levar à falência clínica
- Não há nenhuma evidência clínica, mas dados microbiológicos sugerem que o uso clínico do agente deve ser desencorajado. Não há evidências clínicas de que o teste de emissão de relatórios como sensíveis leve a falhas de clínicas.

### Quadro 13.5 - Fenótipos excepcionais para bactérias gram-positivas.

Organismos	Fenótipo excepcional
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistência a vancomicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina, daptomicina, tigeciclina
<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	Resistência a vancomicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina, daptomicina, tigeciclina

Adaptado de EUCAST.<sup>32</sup>

## ► Tendências sobre métodos laboratoriais de isolamento e identificação

É de comum acordo entre os microbiologistas que o isolamento e identificação dos estafilococos, ou qualquer agente patogênico que esteja associado a doença, necessita ser realizado o mais rapidamente possível.

Como apresentado neste capítulo, o isolamento de cocos gram-positivos não é difícil. Os meios de cultura enriquecidos com sangue de carneiro facilitam a visualização do halo de hemólise, produzido por hemolisinas estafilocócicas. A identificação bacteriana por meio de provas metabólicas clássicas, bioquímicas ou enzimáticas descritas nos livros de microbiologia ou mesmo os esquemas simplificados para identificação de rotina de espécies humanas de estafilococos está sendo substituída gradativamente por métodos automatizados. Atualmente, a maioria dos sistemas automatizados de microbiologia (VITEC, BACTEC etc.) é capaz de isolar e identificar grande parte dos estafilococos em nível de espécie, com testes rápidos e seguros.

### Quadro 13.4 - Resistência intrínseca das bactérias gram-positivas.\*

Organismos	Ácido fusídico	Ceftazidima	Cefalosporinas (exceto ceftazidima)	Aminoglicosídeos	Lincosamidas	Quinupristina-daltopristina	Vancomicina	Teicoplanina	Fosfomicina	Novobiocina	Nitrofurantoína	Sulfametoxazol-trimetoprima
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		R							R	R		
<i>Staphylococcus cohnii, xylosus</i>		R								R		
<i>Staphylococcus capitis</i>		R							R			
Outros <i>Staphylococci</i> coagulase-negativos e <i>S. aureus</i>		R										
<i>Streptococcus</i> spp.	R			LLR								
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	LLR	R	R						(R) <sup>1</sup>
<i>Enterococcus gallinarum, casseliflavus</i>	R	R	R	LLR	R	R	R					(R) <sup>1</sup>
<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	R	LLR <sup>2</sup>								(R) <sup>1</sup>
<i>Lactobacillus</i> spp. (algumas espécies)							R	R				

\*As bactérias gram-positivas também são intrinsecamente resistentes a aztrionam, temocilina, polimixilina B/colistina e ácido nacidíxico.

LLR = resistente a baixos níveis de aminoglicosídeos. A combinação de aminoglicosídeos com inibidores de parede celular (penicilina e glicopeptídeos) é sinérgica e bactericida contra isolados que são suscetíveis a inibidores de parede celular e não mostram resistência a altos níveis de resistência a aminoglicosídeos.

<sup>1</sup>*Enterococci* são normalmente suscetíveis *in vitro* à combinação de sulfametoxazol-trimetoprima, apesar de serem resistentes às sulfonamidas sozinhas. O uso de sulfametoxazol-trimetoprima contra enterococos permanece controverso. É provavelmente preferível evitar em infecções graves.

<sup>2</sup>Em adição à baixa resistência aos glicopeptídeos, *E. faecium* produz uma enzima cromossômica AAC(6') que é responsável pela perda de sinergismo entre aminoglicosídeos (exceto gentamicina, amicacina e estreptomicina) e penicilinas ou glicopeptídeos.

Fonte: Adaptado de EUCAST.<sup>32</sup>



A substituição dos métodos clássicos no laboratório de microbiologia por métodos moleculares de identificação é uma tendência mundial. As técnicas clássicas, porém, deverão permanecer como padrão-ouro para elucidar casos que o diagnóstico molecular não esclareceu, ressaltando também que o avanço tecnológico no laboratório de microbiologia é dispendioso e requer profissionais altamente qualificados, o que dificulta a introdução das novas metodologias.

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos são atualmente as ferramentas diagnósticas mais importantes na detecção de cepas resistentes de estafilococos em nosso meio, ao lado da metodologia molecular de identificação de genes de resistência. As técnicas atuais para determinação de suscetibilidade a antimicrobianos determinada pelo E-test facilita o trabalho laboratorial, mas não exclui as técnicas clássicas preconizadas pelo NCCLS sobre testes *in vitro* de antibióticos (concentração inibitória mínima), uma vez que novos antimicrobianos estão sendo constantemente desenvolvidos e eventualmente sejam alternativas terapêuticas nas infecções muito graves por *S. aureus* panresistentes.

Portanto, além de estar qualificado para a cultura de amostras clínicas, isolamento e identificação automatizada, o microbiologista atual necessita também ter noções de epidemiologia, controle de organismos multirresistentes e treinamento específico para executar técnicas moleculares, que não se limitam mais aos laboratórios de pesquisa, já sendo utilizadas na rotina diagnóstica.

O controle de resistência nas bactérias gram-positivas requer uma abordagem multidisciplinar, incluindo vigilância contínua e aperfeiçoada, redução do uso desnecessário de antibióticos e a aplicação de novas estratégias, como vacinação.

## ► Referências bibliográficas

- Bartlett JG. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Top HIV Med* 2008 Dec; 16(5):151-155.
- Ladhani S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:301-307.
- CDC. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. *US MMWR* 1997; 46:626-628, 635.
- Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clinical Infectious Diseases* 1974; 24:545-556.
- Noble WC, Virani Z, Cree RG. Cotransfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 72:195-198.
- CDC. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *US MMWR* 1997b; 46(33). Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/staphv.htm>.
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponível em: [http://eucast.www137.server1.mensemmedia.net/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID\\_Library/3Publications/EUCAST\\_Documents/Other\\_Documents/EUCAST\\_Expert\\_rules\\_final\\_April\\_20080407.pdf](http://eucast.www137.server1.mensemmedia.net/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Other_Documents/EUCAST_Expert_rules_final_April_20080407.pdf). Acesso em setembro de 2009.
- Jones RN, Ballow CH, Biedenback DJ *et al.* Antimicrobial activity of quinupristin-dalfopristin (RP 59500, Synercid) tested against over 28,000 recent clinical isolates from 200 medical centers in the United States and Canada. *Diag Microbiol Infect Dis* 1998; 31(3):437-451.
- Schwalbe RS, Ritz WJ, Verma PR *et al.* Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *J Infect Dis* 1990; 161:45-51.
- Daum RS, Gupta S, Sabbagh R *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teichoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *J Infect Dis* 1992; 166:1066-1071.
- Garrett DO, Jochimsen E, Murfitt K. The impending apocalypse: the emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus spp.* [Abstract S1]. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: P32.
- Razmjou RG, Willemsen SP, Koning S *et al.* Determinants of regional differences in the incidence of impetigo. *Environ Res* 2009 Jul; 109(5):590-593. Epub 2009 Apr 14.
- Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol* 2009 Apr; 47(4):1172-1180. Epub 2009 Jan 14.
- Bannerman TL, Peacock S. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase positive cocci. In: Murray PR *et al.* (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9 ed., Vol. 1. Washington, DC: ASM Press, 2007; 390-411.
- Cowan ST, Steel KJ. *Manual for the identification of medical bacteria*. 2 ed. Cambridge, London: Cambridge University Press 1981; 45-53.
- Kloos WE, Lambe DW. *Staphylococcus*. In: Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL *et al.* *Manual of Clinical Microbiology*. 5 ed., Washington: American Society for Microbiology 1991; 222-237.
- Tanasupawait S, Hashimoto Y, Ezaki T *et al.* *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from fermented fish in Thailand. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:577-581.
- Probst AJ, Hertel C, Richter L *et al.* *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fisher 1982) subsp. utilis subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48:651-658.
- Foster G, Ross HM, Hutson RA *et al.* *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:724-726.
- Hájek V, Ludwig W, Schleifer KH *et al.* *Staphylococcus muscae*, a new species isolated from flies. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 42: 97-101.
- Chesneau O, Morvan A, Grimont F *et al.* *Staphylococcus pasteuri* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43:237-244.
- Lambert LH, Cox T, Mitchell K *et al.* *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 511-518.
- Zakrzewska-Czerwinska J, Gaszewska-Mastalarz A, Lis B *et al.* *Staphylococcus pulvereri* sp. nov., isolated from human and animal specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 169-172.
- Schleifer KH, Kloos WE. A simple test for the separation of staphylococci from micrococci. *J Clin Microbiol* 1975; 1:337-338.
- Leme IL. Detecção de anticorpos antiácido teicoico nas infecções estafilocócicas – Padronização de testes sorológicos. São Paulo, 1991. [Tese, mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.]
- Leme IL, Caselli R, Pignatari ACC *et al.* Antibodies to teichoic acid extracted from clinical isolates of *S. aureus*. In: VIIth International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Stockholm, Sweden, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Resumos, 1992.
- Finegold SM, Jobarom E. Micrococaceae: staphylococci and micrococci. In: Bayley & Scott's Diagnostic Microbiology. 17 ed. St Louis: Mosby Company, 1986.
- Hedstrom SA. Focus on some basic problems in staphylococcal diseases. *Scand J Infect Dis* 1983; (Suppl.) 41:15-16.
- 28a. Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory clinical and epidemiological aspects of coagulase negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 281-299.
- Pfaller MA. Typing methods for epidemiologic investigation. In: Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL *et al.* *Manual of Clinical Microbiology*. 5 ed. Washington: American Society for Microbiology 1991; 171-182.
- Towsend DE. The international spread of methicillin-resistant *S. aureus*. *J Hosp Infect* 1987; 9:60-70.
- Locksley RM, Cohen ML, Quinn TC, Tompkins LS, Coyle MB, Kiriara JS, Counts GW. Multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann Int Med* 1982; 97:317-324.
- EUCAST. Expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Tables 8, 11, 13, 2008 version 1, april.
- Chambers HF, Sachdeva M, Kennedy S. Binding affinity for penicillin-binding protein 2a correlates with *in vivo* activity of betalactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1990; 162:705-710.
- Page MG. Anti-MRSA betalactams in development. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 5:480-485.
- Le Goffic F, Martel A, Witzchitz J. 3-N enzymatic acetylation of gentamicin, tobramycin, and kanamycin by *Escherichia coli* carrying an R factor. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6:680-684.
- Courvalin P, Davies J. Plasmid-mediated aminoglycoside phosphotransferase of broad substrate range that phosphorylates amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11:619-24.
- Le Goffic F, Baca B, Soussy CJ *et al.* ANT(4')I: a new aminoglycoside nucleotidyltransferase found in "*Staphylococcus aureus*". *Ann Microbiol (Paris)* 1976; 127: 391-399.
- Martel A, Moreau N, Capmau ML *et al.* 2"-O-phosphorylation of gentamicin components by a *Staphylococcus aureus* strain carrying a plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12:26-30.
- Asseray N, Caillon J, Roux N *et al.* Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1591-1593.



40. Jones ME, Visser MR, Klootwijk M *et al.* Comparative activities of ciprofloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin and nonquinolones linezolid, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, and vancomycin against clinical isolates of ciprofloxacin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:421-423.
41. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41 suppl 2:S120-126.
42. Stein GE, Schooley S, Tyrrell KL *et al.* Bactericidal activities of methoxy-fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against aerobic and anaerobic respiratory pathogens in serum. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1308-1312.
43. Santos SI, Mato R, de Lencastre H *et al.* CEM/NET Collaborators and the International Collaborators. Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998. *Microb Drug Resist* 2000; 6:199-211.
44. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34:482-492.
45. Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 2005; 40:280-285.
46. Batard E, Jacqueline C, Boutoille D *et al.* Combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: experimental rabbit endocarditis study. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2174-2178.
47. Fantin B, Leclercq R, Garry L *et al.* Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin *in vitro* and in rabbits with experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:931-935.
48. Entenza JM, Drugeon H, Glauser MP *et al.* Treatment of experimental endocarditis due to erythromycin-susceptible or resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with RP 59500. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1419-1424.
49. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM *et al.* New mechanism for methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1869-1874.
50. Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Engl J Med* 1991; 324:601-612.
51. Boyce JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital long-term care facilities: microbiology, epidemiology and preventive measures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13:725-737.
52. Carles-Nurit MJ, Christophe B, Broche S *et al.* DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2092-2096.
53. Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1989; 320:1188-1196.
54. Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE *et al.* Detection of methicillin-resistant staphylococci using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 16:85-91.
55. Richard P, Meyran M, Carpenter E *et al.* Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:613-617.
56. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med* 2009 Mar; 9(2):100-115.
57. Gubbay JB, Gosbell IB, Barbagiannakos T *et al.* Clinical features, epidemiology, antimicrobial resistance, and exotoxin genes (including that of Panton-Valentine leukocidin) of gentamicin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (GS-MRSA) isolated at a paediatric teaching hospital in New South Wales, Australia. *Pathology* 2008 Jan; 40(1):64-71.
58. Branchini MLM, Moethland VT, Nowakonsky AV *et al.* Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. *Diag Microbiol Infect Dis* 1993; 17:275-281.
59. Nahaie MR, Goodfellow M, Harwood CR. A rapid screening procedure for staphylococcal plasmid. *J Microbiol Methods* 1984; 2:73-81.
60. Zuccarelli AJ, Roy I, Harding GP *et al.* Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:97-102.
61. Mulligan ME, Arbeit RD. Epidemiologic and clinical utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991; 12:21-28.
62. Birren B, Lai E (ed.). Pulsed-field gel electrophoresis: a practical guide. San Diego: Academic Press 1993; 253 p.
63. Lai E, Birren BW, Clark SM *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechniques* 1989; 7:34-42.
64. Mendonza M, Meugnier H, Bes M *et al.* Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48(Pt3):1049-1055.
65. Sloos JH, Janssen P, Van Boven CP *et al.* AFLP typing of *Staphylococcus epidermidis* in multiple sequential blood cultures. *Res Microbiol* 1998; 149(3):221-228.
66. Schmitz FJ, Steiert M, Hofmann B *et al.* Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 1998; 47(4):335-340.
67. Melin S, Hæggman S, Olsson-Liljequist B *et al.* Epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2009; 41: (6,7): 433-439(7).
68. Oeding P *et al.* Antibodies to *S. aureus* peptidoglycan and lipoteichoic acid in staphylococcal infections. *Scand J Infect Dis* 1983; 41(suppl):126-129.
69. Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A *et al.* Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by PCR-RFLP of *SPA* gene: A reference laboratory perspective. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27:116-122.
70. Vindel A, Martin-Bourgon C, Saez-Nieto J. Characterization of non-typable strains of *S. aureus* from cases of hospital infection. *Epidemiol Infect* 1987; 99:191-200.
71. Macdougall LK, Hornsberry C. New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 1984; 19:482-488.
72. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 28:85-92.
73. Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:173-186.
74. Frebourg NB, Nouet D, Lemée L *et al.* Comparison of ATB Staph, Rapid ATB Staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:52-57.



## Capítulo 14

---

# Estreptococcias

*Sandra Trevisan Beck*

- Classificação geral e etiopatogenia, 184
- Streptococcus pyogenes, 184
- Streptococcus agalactiae, 187
- Streptococcus pneumoniae, 189
- Vacinas, 190
- Referências bibliográficas, 191



## ► Classificação geral e etiopatogenia

As bactérias do gênero *Streptococcus* pertencem à família Streptococcaceae, sendo constituídas por cocos gram-positivos, os quais são responsáveis por diversas infecções humanas. De modo geral, os estreptococos de importância humana podem lisar ou não hemácias produzindo, em meio de cultura contendo sangue de carneiro, hemólise total ( $\beta$ -hemólise), parcial ( $\alpha$ -hemólise) ou não produzir hemólise ( $\gamma$ -hemólise). Os estreptococos podem ser classificados por suas características antigênicas. Essa classificação, com base em reações sorológicas, foi realizada inicialmente por Rebecca Craighill Lancefield, em 1933.<sup>1</sup> A classificação baseia-se nas características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, localizado na parede da célula. Tomando por base esse polissacarídeo, os estreptococos foram divididos em 20 grupos sorológicos (grupos de Lancefield) designados por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V).<sup>2</sup> Os estreptococos mais envolvidos em infecções humanas são o *Streptococcus pyogenes*, o *S. agalactiae* e o *S. pneumoniae*, abordados neste capítulo.

Inicialmente, a classificação de Lancefield, utilizando reações de precipitação com soros específicos, identificou diferentes sorogrupos de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos; contudo, posteriormente, foi observado que determinadas cepas  $\gamma$  e  $\alpha$ -hemolíticas também podiam apresentar antígenos grupo-específicos, embora a maioria das cepas desses grupos não os apresente. Por esse parâmetro, os estreptococos que não contêm os antígenos de Lancefield são classificados como não agrupáveis, devendo ser identificados por testes bioquímicos. Entre estes, será abordado neste capítulo o *Streptococcus pneumoniae*, por sua relevância clínica e suas mudanças ocorridas na prevalência das infecções por este agente em razão de novas vacinas disponíveis.

Infecções supurativas por estreptococos  $\beta$ -hemolíticos de grupos não A,  $\alpha$ -hemolíticos e não hemolíticos são cada vez mais frequentemente relatadas na literatura médica. Entretanto, o estreptococo  $\beta$ -hemolítico do grupo A (*S. pyogenes*) é ainda o patógeno mais importante deste grupo, pela frequência com que causa infecção no homem, por ser o agente mais comum da escarlatina e erisipela e pela inequívoca relação com as complicações não supurativas, como a cardiopatia reumática. O grupo B apresenta como representante o *Streptococcus agalactiae*, importante por causar infecções perinatais na mãe e no feto.<sup>2</sup>

As infecções estreptocócicas invasivas ocorrem dependendo tanto da condição do hospedeiro, que pode apresentar deficiência do sistema imune, como das características bacterianas, que variam na sua capacidade de produzir fatores de virulência. Podem produzir ainda um amplo espectro de doenças de localização e curso variáveis, como piodermas, erisipelas, celulites, linfangites, faringoamigdalites, escarlatinas, sinusites, otites, pneumonias, abscessos, septicemia, endocardites e infecções urinárias.<sup>3</sup>

## ► *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* é uma bactéria do tipo coco gram-positivo,  $\beta$ -hemolítico e que pertence ao grupo A de Lancefield. A parede celular de *S. pyogenes* é formada por três camadas distintas, sendo que a camada superficial contém as

proteínas M, R e T. As proteínas M e T são marcadores imunológicos de sorotipos dentro de uma espécie. Esses marcadores, por serem de natureza proteica e capazes de estimular a síntese de anticorpos, possibilitaram a classificação de 85 sorotipos de estreptococos do grupo A.<sup>1</sup> A maioria das cepas patogênicas ao homem pertencem ao sorogrupo A. A camada mais interna da parede celular é formada por um mucopeptídeo que confere à parede celular rigidez e forma. Em relação à cápsula de ácido hialurônico, estudos têm sugerido seu papel na resistência à fagocitose e no aumento da virulência de estreptococos do grupo A.<sup>4</sup>

Produtos extracelulares liberados pelo *S. pyogenes* exercem também importante atividade biológica.<sup>5</sup> Dentre esses produtos, destacam-se as exotoxinas. Na escarlatina, que se caracteriza por uma erupção eritematosa difusa, o fator responsável por essas erupções é a produção e subsequente circulação de toxina eritrogênica produzida por estreptococos do grupo A.<sup>6</sup> Além desta, duas toxinas denominadas hemolisinas são também elaboradas pela maior parte das cepas de *S. pyogenes*: a estreptolisina (SLO), que é antigênica, e a estreptolisina S, não antigênica. Outros produtos extracelulares, como as enzimas hialuronidase, nicotinamida adenina dinucleotidase (NADase), desoxirribonucleases A, B, C, e D (DNases) e estreptoquinase são de interesse, uma vez que são imunogênicos. A enzima cisteína protease do estreptococo do grupo A é considerada um importante fator de virulência, e estudos têm sido realizados quanto ao seu papel na disseminação, colonização e invasão da bactéria. Essa enzima cliva a fibronectina humana e degrada a vitronectina.<sup>7</sup> Outros estudos sugerem que as cisteínas proteases aumentam a habilidade dos estreptococos do grupo A de invadirem células epiteliais respiratórias humanas.<sup>8</sup>

Algumas toxinas bacterianas, conhecidas como superantígenos, ligam-se a moléculas de classe II na região externa, fora do sítio de interação com o peptídeo e não necessitam ser processadas como outros antígenos proteicos. Portanto, os superantígenos podem estimular grande número de células T CD4<sup>+</sup>, levando à produção exagerada de citocinas e a anormalidades clinicopatológicas graves.<sup>9,10</sup>

As infecções causadas por esse patógeno podem acometer indivíduos de diversas faixas etárias; porém, acometem preferencialmente indivíduos entre 5 e 18 anos de idade, afetando adultos jovens na idade mais produtiva.<sup>11,12</sup> O contágio ocorre por contato direto por meio de secreções, favorecendo a disseminação do *S. pyogenes* em ambientes em que há muitas pessoas.<sup>13</sup>

As formas clínicas importantes desta infecção são: angina estreptocócica, piodermite, escarlatina, erisipela (tipo específico de celulite superficial caracterizada por lesão eritematosa) e faringoamigdalite. Como sequelas importantes de faringoamigdalite causada por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo A, citam-se a glomerulonefrite difusa e aguda (GNDA), mediada por imunocomplexos, bem como a febre reumática aguda (FRA) e a cardiopatia reumática crônica (CRC), como complicações não supurativas dessa infecção.<sup>14-16</sup>

A FRA parece ser quase sempre uma complicação da infecção faríngea, enquanto a GNDA pode ocorrer tanto após uma infecção de pele quanto da faringe. Os germes causadores das estreptococcias cutâneas muitas vezes colonizam a garganta; porém, as cepas faríngeas reumatogênicas não colonizam a pele.<sup>17</sup> Os episódios de febre reumática ocorrem de 1 a 5 semanas após o episódio de faringoamigdalite. Já o período latente da GNDA é, em média, 10 dias após a infecção da faringe.<sup>18,19</sup>



A FRA passa a ter relevância entre as formas clínicas dessa infecção, uma vez que, de acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que anualmente no Brasil ocorram cerca de 10 milhões de faringoamigdalites estreptocócicas, perfazendo o total de 30.000 novos casos de FRA, dos quais aproximadamente 15.000 poderiam evoluir com acometimento cardíaco, apresentando lesões do miocárdio e válvulas cardíacas, sendo considerada a sequela mais grave da infecção estreptocócica.<sup>20</sup>

A patogênese da FRA tem componentes genéticos e ambientais. Estima-se que 0,3 a 3% dos indivíduos infectados por cepas de estreptococos sabidamente reumatogênicas desenvolvam febre reumática.<sup>21</sup>

A doença caracteriza-se por lesões inflamatórias, não supurativas, envolvendo o tecido cardíaco, as articulações, o tecido celular subcutâneo e o sistema nervoso central (SNC). Sintomas secundários ao envolvimento do SNC, como coreia de Sydenham, são menos frequentes, mas muito sugestivos, ocorrendo de 3 a 6 meses após a infecção.<sup>21</sup> A hipótese mais aceita para a patogênese cardíaca da febre reumática é a existência de antígenos comuns aos tecidos cardíacos e a determinadas estruturas da célula estreptocócica, como a proteína M da membrana citoplasmática, levando a uma reação cruzada, em que anticorpos e linfócitos T do hospedeiro, dirigidos contra antígenos estreptocócicos, também reconhecem estruturas do hospedeiro, iniciando o processo de autoimunidade.<sup>22</sup> As lesões valvares podem ser crônicas e progressivas, levando a lesão cardíaca. O diagnóstico tem sido fundamentado nos critérios de Jones, modificados em 1992<sup>23</sup> (Quadro 14.1), e revisados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2004.<sup>24</sup>

A associação entre antígenos HLA específicos e doenças autoimunes graves tem levado a extensas pesquisas para associação entre HLA específico e FRA, e têm-se encontrado resultados variáveis em diferentes partes do mundo. No Brasil, pacientes com FRA têm predominância de HLA DR7 e Dw53.<sup>25</sup> É possível que diferentes cepas de estreptococos estejam envolvidas e que as diversas moléculas HLA de classe II reconheçam peptídeos antigênicos diferentes. Outros marcadores genéticos associados ao desenvolvimento da FRA e relacionados com a resposta inflamatória foram identificados recentemente, como alelos que codificam para a produção de proteínas proinflamatórias, como TNF- $\alpha$  e o alelo responsável pela deficiência na produção da lecitina ligadora da manose (MBL), que tem a função de eliminar a bactéria pela ativação do complemento na fase inicial da infecção.<sup>26,27</sup>

#### Quadro 14.1 • Critérios de Jones.

Critérios maiores	Critérios menores
Cardite	Febre
Poliartrite migratória	Artralgia
Coreia de Sydenham*	Elevação de provas de fase aguda**
Nódulos subcutâneos	PR prolongado no eletrocardiograma
Eritema marginado	

Evidências de infecção recente por estreptococos do grupo A (cultura positiva de faringe, teste rápido de detecção de antígenos ou título de anticorpos antiestreptocócicos elevado ou crescente).

\*Exceção: único sinal maior que isoladamente permite o diagnóstico.

\*\*Velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa.

## ▪ Resposta imune ao *S. pyogenes*

Uma faringite estreptocócica, na maioria dos pacientes, leva a resposta de anticorpos aos produtos extracelulares de *S. pyogenes*. Assim, os possíveis anticorpos detectáveis são: anti-SLO (antiestreptolisina O – ASLO), antiestreptoquinase (ASK), anti-hialuronidase (AHAD), antidesoxirribonuclease-B (ADNase-B), antinicotinamida adenina dinucleotidase (ANADase) e antiesterase (ASE).<sup>17</sup>

Os níveis de anticorpos alcançam um pico entre a 2ª e a 3ª semana após a infecção aguda, permanecem em um patamar por 3 a 6 meses e, gradualmente, declinam a níveis normais, após mais 3 a 6 meses. A resposta de anticorpos a qualquer estreptococo varia de um indivíduo para outro e depende do local da infecção.<sup>28</sup>

Em casos de infecção cutânea, há um aumento de ADNase-B em aproximadamente 95% dos casos, enquanto os níveis de ASLO mantêm-se elevados em 45% apenas. Este fato pode ser explicado correlacionando-se a presença de lipídios nas células cutâneas que modificam a antigenicidade da SLO.<sup>29</sup> Dessa maneira, a detecção concomitante de níveis de ASLO e de ADNase-B possibilita o aumento na eficiência em diagnosticar 97% dos casos.<sup>30</sup>

Nos indivíduos com escarlatina, os níveis de ASLO elevam-se consideravelmente na 4ª semana após o início da doença, vindo a decrescer gradualmente, por cerca de 1 ano, até alcançarem os níveis encontrados no início da doença.<sup>31</sup>

Na GNDA, uma semana após o início da infecção, os níveis de ASLO, ASK, AHAD, ANADase começam a elevar-se, alcançando valores máximos após 3 a 4 semanas.<sup>32</sup>

Na FRA, os anticorpos são importantes durante sua fase inicial e, provavelmente, pelas manifestações de poliartrite e coreia de Sydenham. Na cardite reumática, anticorpos reativos ao tecido cardíaco, por reação cruzada com antígenos do estreptococo, fixam-se à parede do endotélio valvar e aumentam a expressão da molécula de adesão VCAM I, que atrai determinadas quimiocinas e favorece a infiltração celular por neutrófilos, macrófagos e, principalmente, linfócitos T, causando inflamação local, destruição tecidual e necrose.<sup>27</sup> A elevação dos títulos de ASLO se inicia por volta do 7º dia após a infecção e alcança o pico entre a 5ª e a 6ª semana, mantendo-se elevada por meses, às vezes até por 1 ano após a infecção.<sup>33</sup> Ao ser estudada em uma população de pacientes portadores da doença por um período de 3 meses a 6 anos, a normalização dos níveis de ASLO na FRA ocorreu em 4 meses, em média. Além disso, os níveis de ADNase-B e ASK foram normalizados em 35 e 28 meses, respectivamente.<sup>34</sup> Para cada população devem ser determinados os valores de anticorpos ASLO considerados normais, pois há uma variação segundo a faixa etária e a localização geográfica. O limite superior da normalidade, segundo a literatura, pode variar entre 200 UI/mL e 320 UI/mL.<sup>35,36</sup>

## ▪ Diagnóstico laboratorial

### Isolamento em culturas bacterianas e testes rápidos

Os normalmente utilizados para o diagnóstico da infecção por estreptococos  $\beta$ -hemolíticos do grupo A são o teste rápido de detecção de antígeno, realizado por meio de imunoenaios, e o da cultura bacteriana, que fornece o resultado ao fim de 48 h.

Com relação aos testes bacteriológicos, a cultura em meio de ágar-sangue (de coelho ou carneiro) ainda é considerada o melhor teste para diagnóstico direto dos estreptococos



$\beta$ -hemolíticos. Após crescimento das colônias e verificação da presença de  $\beta$ -hemólise, faz-se uma coloração pelo gram e prova de catalase. Ambos são feitos após coleta de exsudato por meio de um *swab*. Muitos dos testes rápidos apresentam especificidade excelente (> 95%) quando comparados com culturas em meio ágar-sangue, e, assim, a terapia antimicrobiana pode ser iniciada com base nos resultados positivos de testes rápidos de boa qualidade. Entretanto, a sensibilidade da maioria dos testes rápidos é inferior à da cultura (80 a 90%); por essa razão, os testes rápidos negativos de crianças e adolescentes apresentando faringoamigdalite devem ser confirmados com a cultura convencional da orofaringe.<sup>38</sup>

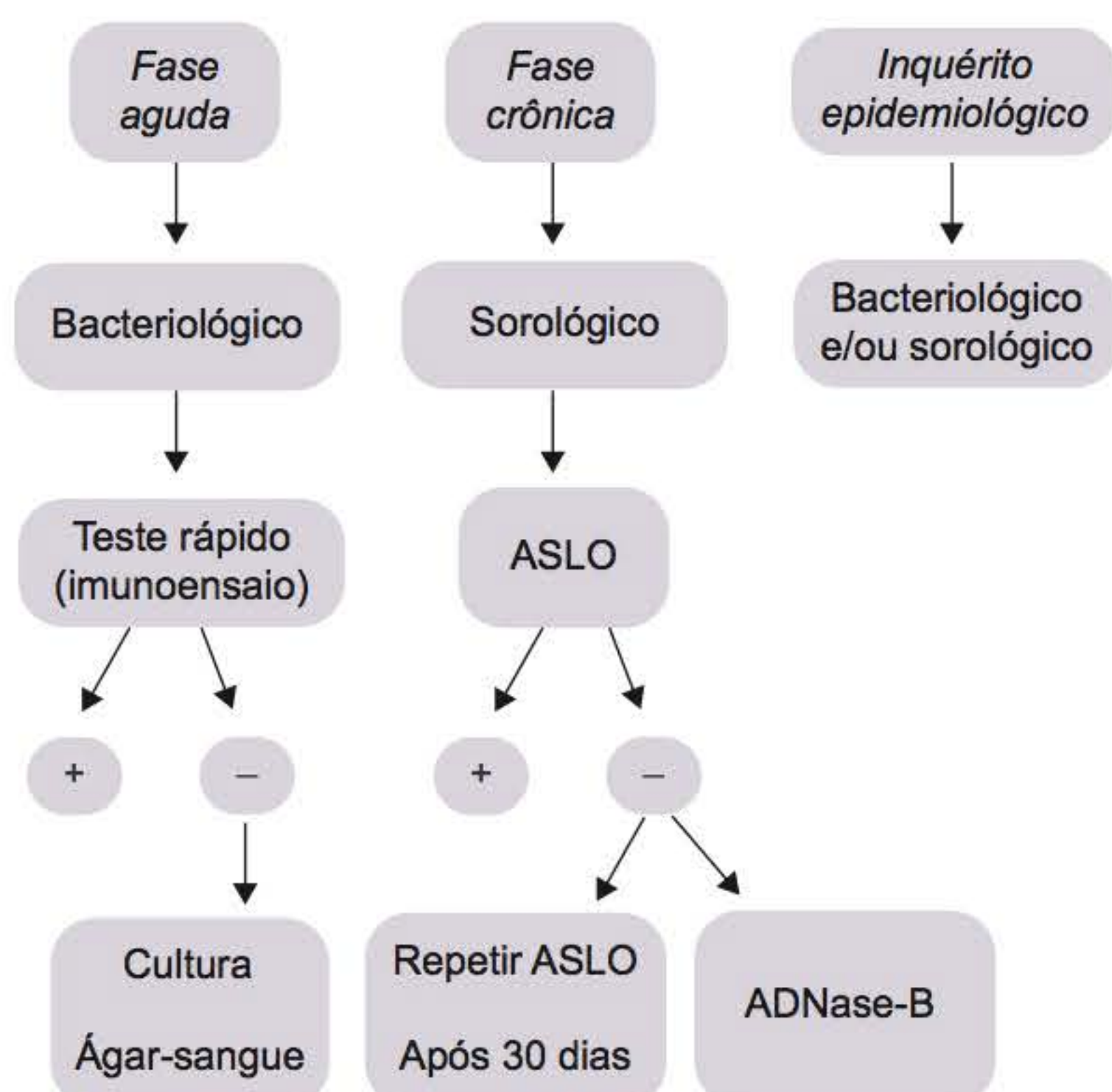
A importância de um teste rápido que confirme a ausência de faringoamigdalite por estreptococos é evitar a utilização inapropriada de antibióticos, uma vez que as faringoamigdalites virais, por exemplo, não necessitam deste tipo de tratamento. O uso indevido de antibióticos pode levar ao aumento de resistência bacteriana, sendo este um risco desnecessário.

### Pesquisa de anticorpos contra diferentes enzimas

A pesquisa associada dos anticorpos contra os produtos extracelulares de *S. pyogenes* (ASLO, ASK, AHAD, ANADase e ASE)<sup>21</sup> pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial da FRA, uma vez que, aproximadamente, 20% dos pacientes com FRA apresentam valores normais de ASLO.<sup>39</sup>

Deve-se ressaltar o valor do teste ADNase-B em pacientes com suspeita clínica de FRA, em que não há resposta de anticorpos ASLO, bem como em pacientes com glomerulonefrite pós-impetigo, em que a resposta de anticorpos ASLO é fraca,<sup>18</sup> uma vez que os anticorpos ASLO aparecem em 80% dos casos de infecção estreptocócica da faringe e em apenas 25% dos casos de infecção cutânea, como a piodermite estreptocócica (Figura 14.1).<sup>40</sup>

Para determinar uma infecção anterior por *S. pyogenes* e seu estado evolutivo, a pesquisa de ASLO é mais usual, seguida de ADNase-B e AHAD,<sup>41</sup> embora a pesquisa dos dois últimos esteja ainda restrita a laboratórios especializados, principalmente institutos de pesquisa.



**Figura 14.1** Diagnóstico presuntivo da infecção por *Streptococcus pyogenes*.

A pesquisa de ASLO, além de constituir uma importante ferramenta para o diagnóstico das infecções pós-estreptocócicas, faz parte dos critérios de Jones para diagnóstico de febre reumática. A detecção de ASLO foi inicialmente descrita por Todd, em 1932.<sup>42</sup> Nessa reação, a hemólise produzida pela SLO, citotóxica para hemácias, é inibida por anticorpos anti-SLO encontrados no soro a ser testado. Por meio da diluição seriada do soro do paciente, determinava-se de modo semiquantitativo a presença de ASLO, sendo os resultados expressos em unidades Todd. A determinação de ASLO por neutralização da hemólise foi muito utilizada, porém tem sido substituída atualmente pela reação com partículas de látex sensibilizadas com estreptolisina O, utilizada tanto em métodos manuais como automatizados. Esses ensaios estão menos sujeitos a reações falso-positivas, motivadas pelos lipídios que, ao se ligarem a SLO, mimetizam a ação neutralizante dos anticorpos. Contudo, turvação intensa também pode interferir nos métodos automatizados. Amostras lipêmicas não devem ser utilizadas sem uma deslipidação prévia por meio de ultracentrifugação a 90.000 g por 10 min. Não dispondo de ultracentrífuga, é recomendável jejum rigoroso do paciente antes da coleta de nova amostra para o ensaio.

### Reação do látex

A reação consiste em acrescentar uma gota de soro diluído e uma gota de partículas de látex recoberta com SLO em uma lâmina de vidro, agitar por 3 min, manualmente, e efetuar a leitura. Esse reagente apresentou boa eficiência diagnóstica: sensibilidade de 91%, especificidade de 86%, valor preditivo positivo de 83% e valor preditivo negativo de 93%.<sup>43</sup>

### Detecção de anticorpos ASLO pelo método nefelométrico ou turbidimétrico

Agregados de antígeno-anticorpo em mistura têm a propriedade de dispersão ou absorção da luz, e, com base nisso, foram desenvolvidos testes nefelométricos e turbidimétricos, respectivamente.<sup>44</sup>

O princípio do teste consiste em recobrir partículas de poliestireno com SLO recombinante, altamente purificada, que, ao entrarem em contato com soro contendo anticorpos ASLO, formam complexos que diminuem a transmissão (turbidimetria) ou dispersam (nefelometria) um feixe de luz incidente. Essa alteração é medida por meio de uma curva de calibração, sendo proporcional à concentração de ASLO no soro. O teste é de simples execução, uma vez que é automatizado.

### Interpretação dos testes sorológicos

Deve-se ressaltar que exames sorológicos traduzem uma infecção pregressa e não têm valor para o diagnóstico do quadro agudo da faringoamigdalite estreptocócica. A dosagem dos títulos de ASLO confirma apenas a existência de infecção estreptocócica anterior. Recomenda-se a realização de duas dosagens de ASLO com intervalo de 15 dias, com utilização dos limites padrão de cada laboratório para a análise dos resultados.<sup>36</sup>

Segundo as Diretrizes Brasileiras para o Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Febre Reumática,<sup>37</sup> os critérios de Jones modificados pela American Heart Association (AHA) em 1992<sup>23</sup> devem ser utilizados para o diagnóstico do primeiro surto da doença, enquanto os critérios de Jones revisados pela OMS e publicados em 2004<sup>24</sup> destinam-se também ao diagnóstico das recorrências da FRA em pacientes com CRC estabelecida.



A probabilidade de FRA é alta quando há evidência de infecção estreptocócica anterior, determinada pela elevação dos títulos da ASLO, além da presença de pelo menos dois critérios maiores ou um critério maior e dois critérios menores de Jones.<sup>37</sup>

## ► *Streptococcus agalactiae*

O *Streptococcus agalactiae* (EGB) é a única espécie pertencente ao sorogrupo B de Lancefield. São identificados nove sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII) importantes, principalmente para investigação epidemiológica, e produção de vacinas, uma vez que a distribuição de sorotipos pode variar de acordo com a região geográfica e o perfil de resistência a antimicrobianos.<sup>45</sup> A maioria das cepas pode apresentar  $\beta$ -hemólise discreta ao redor das colônias ou ausência de hemólise ( $\gamma$ -hemólise), podendo este microrganismo ser confundido com *Enterococcus*.<sup>2</sup> O EGB faz parte da flora de membranas mucosas de seres humanos e animais, colonizando principalmente os tratos intestinal e geniturinário; sua prevalência na população geral é irrelevante. A grande relevância médica desse microrganismo está em grupos especiais, como gestantes e recém-nascidos, em razão de sua associação a infecções invasivas no período perinatal e neonatal, ocasionando quadros graves de septicemia, pneumonia e meningite em neonatos.<sup>46</sup> Na gestante, a colonização pelo EGB é, geralmente, assintomática, podendo a bactéria causar infecção do trato urinário em até 4% das gestações, estando, no puerpério, associada a casos de corioamnionite, endometrite, septicemia materna ou, mais raramente, meningite. A identificação bacteriana na urina é um fator preditivo da intensidade da colonização.<sup>47</sup> Pode vir também a acometer indivíduos com idade superior a 60 anos, que apresentem comorbidades como diabetes melito, doença hepática, neoplasias ou imunodeficiência. Nessa situação, a infecção poderá se apresentar como bacteriemia sem foco definido, peritonite, pneumonia, artrite séptica, entre outras.<sup>48</sup>

A frequência de colonização por EGB durante a gravidez é variável, estando relacionada com diferenças socioculturais, geográficas e com as metodologias bacteriológicas empregadas para sua detecção. Os dados brasileiros são relativamente escassos. Em estudo realizado em São Paulo, as taxas detectadas foram baixas, de 1,9%.<sup>49</sup> Entretanto, em uma avaliação realizada em Salvador, o índice foi de 6,9%;<sup>50</sup> em Minas Gerais, 9,5%<sup>51</sup> e, no Rio de Janeiro, alcançou o índice de 19,2%.<sup>52</sup>

Como a maioria das infecções por EGB pode ser prevenida por profilaxia antimicrobiana intraparto, em 1996, os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) elaboraram um guia para a prevenção da infecção precoce do neonato, o qual foi atualizado em 2002,<sup>46</sup> recomendando a prescrição de quimioprofilaxia em duas situações:

- Em todas as grávidas colonizadas com EGB, de acordo com os resultados da cultura realizadas entre a 35ª e a 37ª semana de gravidez
- Nas grávidas que, não tendo sido submetidas à pesquisa de colonização pelo EGB, apresentassem algum dos fatores de risco para a contaminação da criança, como tempo de ruptura de membrana maior ou igual a 18 h, temperatura igual ou superior a 38°C durante o parto e/ou prematuridade, incluindo ainda no guia atualizado a profilaxia em gestantes que apresentaram bacteriúria por EGB durante a gravidez ou que já tiveram um filho com doença precoce por EGB.<sup>45</sup>

## ▪ Evasão do *Streptococcus agalactiae* à resposta imune

A habilidade do *S. agalactiae*, assim como do *S. pyogenes*, em determinar o aparecimento de um processo infeccioso depende dos seus vários fatores de virulência. Entre eles, a cápsula do EGB é um fator importante, uma vez que apresenta função antifagocítica, por meio do impedimento da deposição de fragmentos opsonizantes C3b do sistema complemento, o qual é reconhecido por macrófagos. Entre as proteínas ligadoras de fibronectina (Fbp), a fibronectina FbsA também contribui para a resistência à fagocitose, protegendo o EGB da opsonização. A presença de uma serinoprotease capaz de clivar o fator C5a do sistema complemento, o qual é responsável pela quimiotaxia de neutrófilos ao sítio da infecção, também contribui para a evasão à resposta imune.<sup>53</sup> Da mesma maneira, a proteína beta, uma das frações proteicas do antígeno C do EGB, interage com a fração Fc da imunoglobulina IgA no soro e fator H, que é uma proteína que regula a via alternativa do sistema complemento, potencializando o mecanismo de escape do patógeno frente ao sistema imune no hospedeiro.<sup>54</sup>

Ainda, a disseminação do patógeno é facilitada pela degradação do ácido hialurônico, componente extracelular de células de tecidos animais, por meio da ação da hialuronidase.<sup>55</sup> Do mesmo modo, a produção de hemolisina pelo EGB parece estar associada a invasão e lesões do epitélio pulmonar e endotelial.<sup>56,57</sup> Outro fator que pode contribuir com a invasão celular é uma proteína extracelular difusível, chamada de fator CAMP, capaz de formar poros e provocar lise de membranas celulares do hospedeiro.<sup>58</sup>

## ▪ Etiopatogenia no recém-nascido

Os recém-nascidos (RN) de gestantes colonizadas pelo *S. agalactiae* apresentam um risco até 29 vezes maior de adquirir infecção precoce do que os recém-nascidos de gestantes cuja cultura tenha sido negativa.<sup>59</sup>

A aquisição da bactéria pode ocorrer no canal de parto ou pela ascensão da bactéria para a cavidade uterina após ruptura de membranas.<sup>60</sup> A aderência do EGB à superfície mucosa representa o evento inicial na colonização e infecção. Uma vez que esse patógeno adere de modo muito eficiente às células do epitélio vaginal e às membranas amnióticas, este passa a ser o fator principal para o recém-nascido adquirir a infecção sintomática ou assintomática.<sup>61</sup>

Embora fatores de defesa do líquido amniótico possam impedir a proliferação do EGB, a deglutição pelo feto de líquido amniótico infectado horas ou dias antes do parto pode resultar em infecção precoce pós-parto.<sup>60</sup> O grau de virulência do patógeno, a maturidade fetal e o número absoluto de microrganismos no canal de parto durante o nascimento estão diretamente relacionados com o risco de o recém-nascido adquirir a infecção e apresentar doença invasiva pelo EGB.<sup>62</sup> Isso tem sido evidenciado por estudos prospectivos, nos quais a incidência de transmissão foi de aproximadamente 51% entre os recém-nascidos de mães portadoras de EGB vaginal e/ou anorretal, durante o parto. Na sua maioria, esses recém-nascidos tornam-se apenas colonizados pelo EGB; porém, 6% dos recém-nascidos de mães com cultura negativa tornam-se infectados assintomáticos em um ou mais locais – orofaringe, pele, umbigo, reto – durante as primeiras 48 h de vida.<sup>63</sup> As formas principais de apresentação da doença neonatal precoce (até o sexto dia de vida) incluem



pneumonia, meningite e bacteriemia sem foco aparente com incidência de 0,7 a 3,7 por 1.000 nascidos vivos.<sup>45</sup> A aquisição da infecção *in utero* manifesta-se ao nascimento geralmente com quadro de choque, insuficiência respiratória grave e coma.<sup>60</sup> Pode haver início tardio, que afeta recém-nascidos com idade acima de 7 dias (média 24 dias), podendo ocorrer até os 3 meses de vida. Nesses casos, a principal manifestação clínica é a meningite, com incidência de 0,5 a 1,8/1.000 nascidos vivos.<sup>47</sup>

## Desenvolvimento de resposta imune

A imaturidade anatômica, bioquímica e imunológica pulmonar do recém-nascido pré-termo, particularmente aqueles de muito baixo peso, favorece a multiplicação rápida EGB e a evolução fulminante da doença.<sup>64</sup>

Estudos em mulheres grávidas e seus filhos têm mostrado que anticorpos maternos formados contra polissacarídeos encontrados na cápsula do EGB são capazes de proteger os recém-nascidos da modo invasivo da infecção por EGB.<sup>65</sup>

O nível de anticorpos maternos anti-EGB é um indicador importante do risco de infecção neonatal, havendo correlação entre níveis baixos de anticorpos maternos (< 2 mg/ml) contra o EGB e a suscetibilidade do recém-nascido à doença invasiva. Como a passagem placentária de imunoglobulina da classe G materna ocorre principalmente nas últimas 8 semanas de gestação, o recém-nascido prematuro é uma criança de risco para a aquisição da doença invasiva pelo EGB.<sup>60,66</sup>

Mais importante é a possibilidade de anticorpos induzidos por meio de vacinação serem transferidos passivamente através da placenta.<sup>67</sup>

## Testes laboratoriais

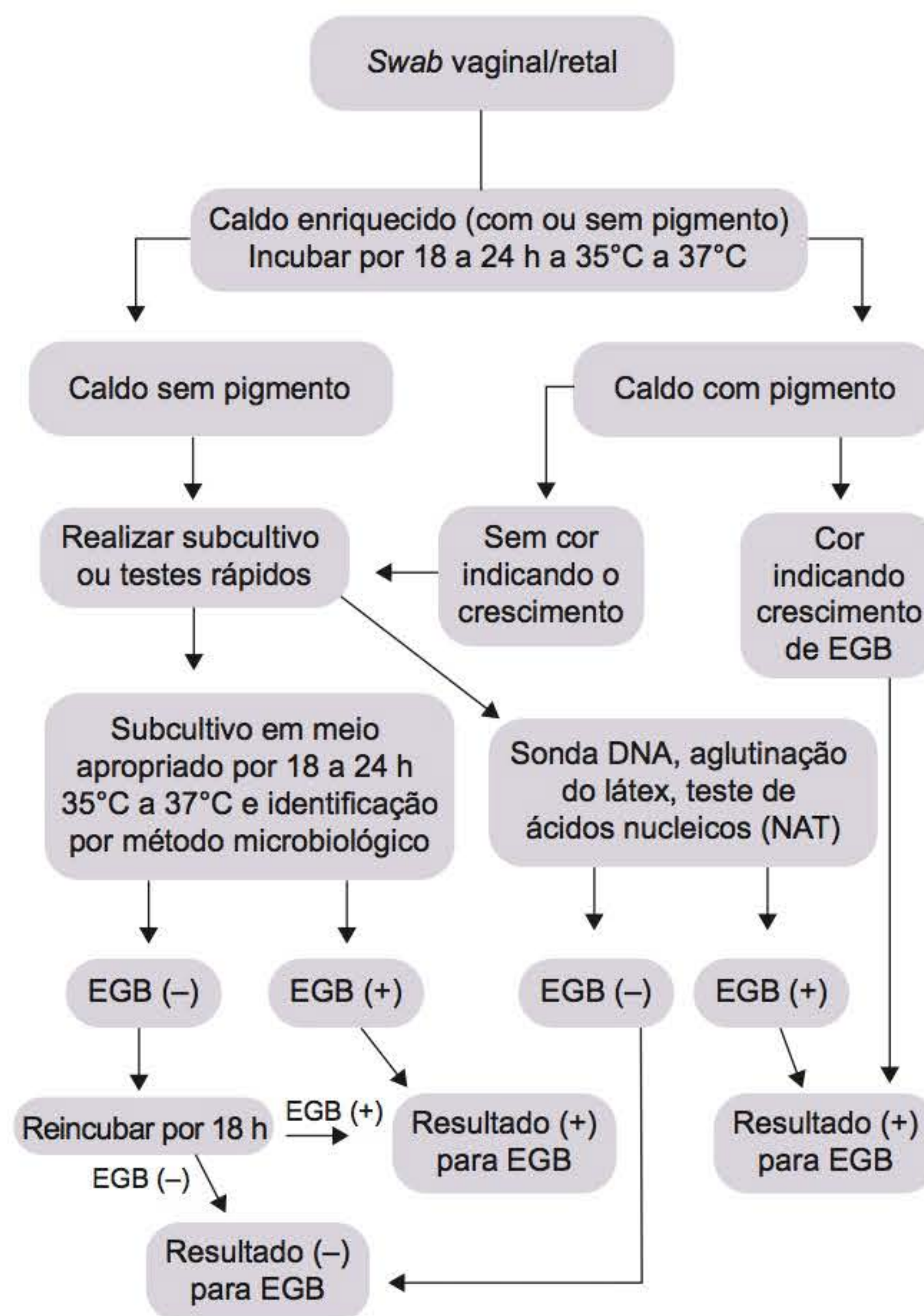
### Diagnóstico de colonização em gestantes

Segundo alguns autores, a cultura bacteriana é considerada o padrão-ouro para a detecção do EGB, quando se utiliza material obtido de coleta vaginal e anal, semeado em meio de cultura específico.<sup>68</sup>

A coleta e cultura microbiológica de material provindo da região vaginal e anal da gestante devem ser realizadas segundo recomendações dos CDC (2002):<sup>46</sup>

- O *swab* deve ser introduzido na parte inferior da vagina e no reto através do esfíncter anal. Pode ser usado o mesmo *swab* ou dois *swabs* diferentes. Amostras cervical, perianal, perirretal ou perineal não devem ser aceitas para cultura
- A amostra deve ser colocada em um meio de transporte não nutritivo, no qual permaneça viável por vários dias à temperatura ambiente
- Para cultura, o *swab* deve ser inoculado em um meio seletivo (como, por exemplo, caldo Todd-Hewitt) suplementado com gentamicina (8 µg/ml) e ácido nalidíxico (15 µg/ml).

Alternativamente os *swabs* podem ser inoculados em um caldo seletivo enriquecido com pigmento cromogênico para detecção da β-hemólise do EGB, utilizando detector de cor (p. ex., Granada®). Deve-se incubar por 18 a 24 h a 35°C a 37°C, com ar ambiente ou com 5% de CO<sub>2</sub>. A Figura 14.2 resume os procedimentos para identificação do EGB.



**Figura 14.2** Algoritmo recomendado para identificação pré-natal de estreptococos do grupo B por testes laboratoriais. Adaptada de CDC, 2002.<sup>46</sup>

Métodos moleculares com base na amplificação de ácidos nucleicos também têm sido estudados, com potencial uso clínico.<sup>69</sup>

### Diagnóstico no recém-nascido

O diagnóstico da infecção neonatal pelo EGB pode ser realizado pelo isolamento do agente infeccioso por meio de cultura microbiológica de fluidos corpóreos (como descrito anteriormente) ou pela detecção do antígeno na urina,<sup>70</sup> liquor,<sup>71</sup> secreção traqueal, secreção faríngea e aspirado gástrico.

A detecção de antígeno na urina por aglutinação de partículas de látex é um exame amplamente utilizado, sensível, porém sem especificidade satisfatória, podendo apresentar resultados falso-positivos na ausência de infecção sistêmica. A análise dos resultados obtidos por esse método de detecção de antígeno deve ser associada a achados clínico-radiológicos e/ou complementada por outros exames laboratoriais.<sup>72,73</sup> Recentemente, a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) também tem sido utilizada, apresentando especificidade e sensibilidade elevadas.<sup>74,75</sup> A realização da PCR, por ser onerosa, fica restrita a centros que tenham condições de disponibilizá-la.

Segundo estudo de revisão de Grassi *et al.* (2001),<sup>76</sup> o diagnóstico da infecção neonatal pelo EGB deve levar em



consideração fatores de risco para a sepse neonatal, avaliação clínica, realização de hemograma, proteína C reativa, cultura de sangue, urina e liquor, bem como a detecção do antígeno capsular do GBS pela técnica de aglutinação na urina e liquor.

## ► *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), também conhecido como pneumococo, é coco gram-positivo da flora do trato respiratório superior, identificado laboratorialmente por cultivo microbiológico em meio e condições adequados.

Sua transmissão acontece de pessoa a pessoa, por meio de gotículas de secreção respiratória de portadores saudáveis que albergam transitoriamente a bactéria na nasofaringe, podendo a colonização ocorrer desde o primeiro dia de vida.<sup>77</sup> A taxa de colonização é maior na infância, sendo fortemente influenciada pela aglomeração de pessoas;<sup>78</sup> pode haver colonização por mais de um sorotipo, por vários meses. Desse modo, as crianças, por apresentarem elevado índice de colonização, assumem papel importante na disseminação horizontal deste patógeno na comunidade.<sup>79</sup> Pelo uso frequente de antimicrobianos na infância, este grupo de portadores também representa um importante reservatório de cepas resistentes.<sup>80,81</sup>

Na maioria das vezes, os pneumococos colonizam a superfície mucosa, conferindo aos indivíduos apenas a condição de portador sadio. Entretanto, na existência de fatores predisponentes do hospedeiro, eles podem invadir sítios estéreis adjacentes ou a corrente sanguínea, causando infecção localizada ou sistêmica.<sup>82</sup>

Em todo o mundo, o *S. pneumoniae* é o mais frequente agente etiológico de infecções adquiridas na comunidade que acometem o sistema respiratório. De acordo com a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano 2000 ocorreram, por ano, 1,4 milhão de casos sérios de doença pneumocócica em crianças menores de 5 anos, causando 735 mil mortes.<sup>83</sup> Além disso, indivíduos imunocomprometidos de todas as idades também fazem parte do grupo de risco para esta infecção.

Sua patogenicidade está relacionada com os polissacarídeos capsulares, os quais determinam sua classificação em sorotipos, designados por número, sendo agrupados segundo suas características estruturais e imunológicas (sistema dinamarquês).<sup>84</sup> Foram identificados até o momento 91 sorotipos de *S. pneumoniae*,<sup>85</sup> sendo que a maioria das doenças pneumocócicas é causada por 23 deles, os quais variam de acordo com a região geográfica considerada.<sup>86</sup> Aproximadamente mais de 70% das doenças pneumocócicas invasivas são causadas por 20 sorotipos, em todos os grupos etários. No Brasil, existem cerca de 10 sorotipos prevalentes, sendo os sorotipos 1 e 6B prevalentes em todas as idades; o sorotipo 14 responsável pela maioria das infecções em crianças, enquanto os sorotipos 3 e 4 são mais comuns em adultos.<sup>87</sup>

## ■ Etiopatogenia da infecção por *Streptococcus pneumoniae*

A presença da cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência da bactéria, protegendo-a da fagocitose pelo sistema imune.<sup>85</sup> Para que ocorra a conversão da coloniza-

ção assintomática para doença invasiva, deve haver a produção local de mediadores inflamatórios como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), associado a fatores de risco do hospedeiro como: asplenia, deficiências congênitas envolvendo imunoglobulinas ou proteínas do complemento, e outros (Quadro 14.2).<sup>82</sup> Ocorrendo uma ou mais destas condições, o pneumococo, por meio de invasão local, pode levar ao aparecimento de otite média ou sinusite, sendo estes os casos mais comuns e menos graves de doença não invasiva da infecção. Caso ocorra aspiração, o *S. pneumoniae* chega aos alvéolos pulmonares, onde pode progredir para pneumonia. A fagocitose ineficiente provoca um processo inflamatório intenso mediado por componentes da parede celular da bactéria, provocando edema e acúmulo de fibrina, podendo levar o indivíduo à morte.<sup>88</sup>

As doenças pneumocócicas invasivas (DPI) são definidas como aquelas em que o pneumococo é identificado em sítios habitualmente estéreis. As menos frequentes são peritonite, empiema e artrite; as mais importantes são meningite e septicemia. As bactérias alcançam a corrente sanguínea tanto pelo epitélio pulmonar lesionado como pelo sistema linfático. As meninges são atingidas pela passagem do pneumococo através da corrente sanguínea ou diretamente da cavidade nasal para o cérebro.<sup>90</sup>

A DPI é menos comum que a pneumonia pneumocócica, mas seu diagnóstico microbiológico é inequívoco, sendo então utilizado como indicador de importância da doença pneumocócica. O risco de DPI em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é 50 a 100 vezes maior que em indivíduos não infectados com HIV. A bacteriemia por pneumococo aumenta com o declínio no número das células T CD4<sup>+</sup>, podendo ocorrer no início da manifestação do HIV e na ausência de terapia antirretroviral.<sup>91</sup>

## ■ Identificação do *Streptococcus pneumoniae*

O *S. pneumoniae* é rotineiramente identificado pelas suas características fenotípicas: morfologia da colônia em placa com ágar-sangue, solubilidade em bile, sensibilidade a optoquina e presença de cápsula.<sup>91</sup> Métodos bioquímicos e sorológicos foram publicados recentemente, demonstrando alta sensibilidade, mas especificidade limitada.<sup>92</sup> Métodos moleculares também têm sido desenvolvidos,<sup>93</sup> sendo uma ferramenta importante para estudos epidemiológicos.

### Quadro 14.2 ■ Pessoas mais suscetíveis a infecções pneumocócicas invasivas.

Crianças menores de 5 anos e idosos (> 65 anos)
Pessoas que apresentem imunodeficiência congênita ou adquirida (incluindo HIV), ou em tratamento com imunossupressores (doenças malignas ou transplante de órgãos sólidos ou medula)
Portadores de asplenia anatômica ou funcional, incluindo anemias hemolíticas, como anemia falciforme e esferocitose)
Portadores de doenças crônicas (nefropatias, doenças cardiorrespiratórias, diabetes, alcoolismo, cirrose, asma, doenças de depósito e trissomias)
Indivíduos com fratura de crânio, fistula líquórica e submetidos a cirurgia de crânio, incluindo colocação de implante coclear
Após infecções virais, particularmente <i>influenza</i> e vírus sincicial respiratório

WHO, 2008.<sup>89</sup>



## ▪ Resposta imune ao *Streptococcus pneumoniae*

Além da fagocitose e a morte intracelular pelos macrófagos alveolares e neutrófilos (imunidade inata), a imunidade adaptativa é parte importante na defesa do hospedeiro contra o pneumococo, uma vez que, na presença de anticorpos anticapsulares, a opsonização é mais eficiente, há ativação da cascata do complemento, dando origem a frações C3b, que facilitam a fagocitose por macrófagos, eliminando a bactéria.<sup>94</sup>

A resposta imune adaptativa envolve a participação dos linfócitos B e T. A população portadora do marcador de superfície CD4 (T auxiliar) é dividida em duas subpopulações principais, T auxiliar 1 (Th1) e T auxiliar 2 (Th2). A função primordial da população Th2 é auxiliar o linfócito B a se diferenciar, replicar e originar plasmócitos que secretarão anticorpos de diferentes especificidades e classes. Este tipo de resposta é induzido por antígenos proteicos complexados aos antígenos de histocompatibilidade (HLA de classe II) e chamado de T-dependente. As células Th1 também auxiliam os linfócitos B a produzirem anticorpos, mas secretam diferentes citocinas, como a interferona e o fator de necrose tumoral, que auxiliam ativando principalmente as respostas celulares.<sup>95</sup>

Em contrapartida, os pneumococos, por apresentarem uma cápsula composta por polissacarídeos, induzem resposta imunológica T-independente. Neste tipo de resposta, o estímulo para a produção de anticorpos pelos linfócitos B é feito de modo direto, sem auxílio das interleucinas produzidas pelo T auxiliar. Com isso, as imunoglobulinas produzidas são preferencialmente IgM e IgG2, não sendo induzida a formação de memória imunológica (Figura 14.3). Tal tipo de resposta,

em razão da imaturidade do sistema imune, não ocorre em crianças com menos de 2 anos e é deficiente em indivíduos imunodeprimidos, levando estes dois grupos a apresentarem maior risco de desenvolver infecção por pneumococo.<sup>96</sup>

## ► Vacinas

### ▪ *Streptococcus agalactiae*

Em razão da possibilidade de anticorpos induzidos por meio de vacinação serem transferidos passivamente através da placenta, vacinas conjugadas que incluem proteínas do EGB, capazes de estimular a resposta imune a componentes polissacarídeos deste microrganismo, já estão sendo alvo de pesquisa.<sup>98</sup> Contudo, as preparações vacinais, atualmente desenvolvidas, têm sido efetivas somente contra alguns sorotipos do EGB, mais prevalentes em algumas regiões geográficas do mundo,<sup>99</sup> sendo necessário ainda determinar a sua real efetividade e validação em larga escala.<sup>100</sup>

### ▪ *Streptococcus pyogenes*

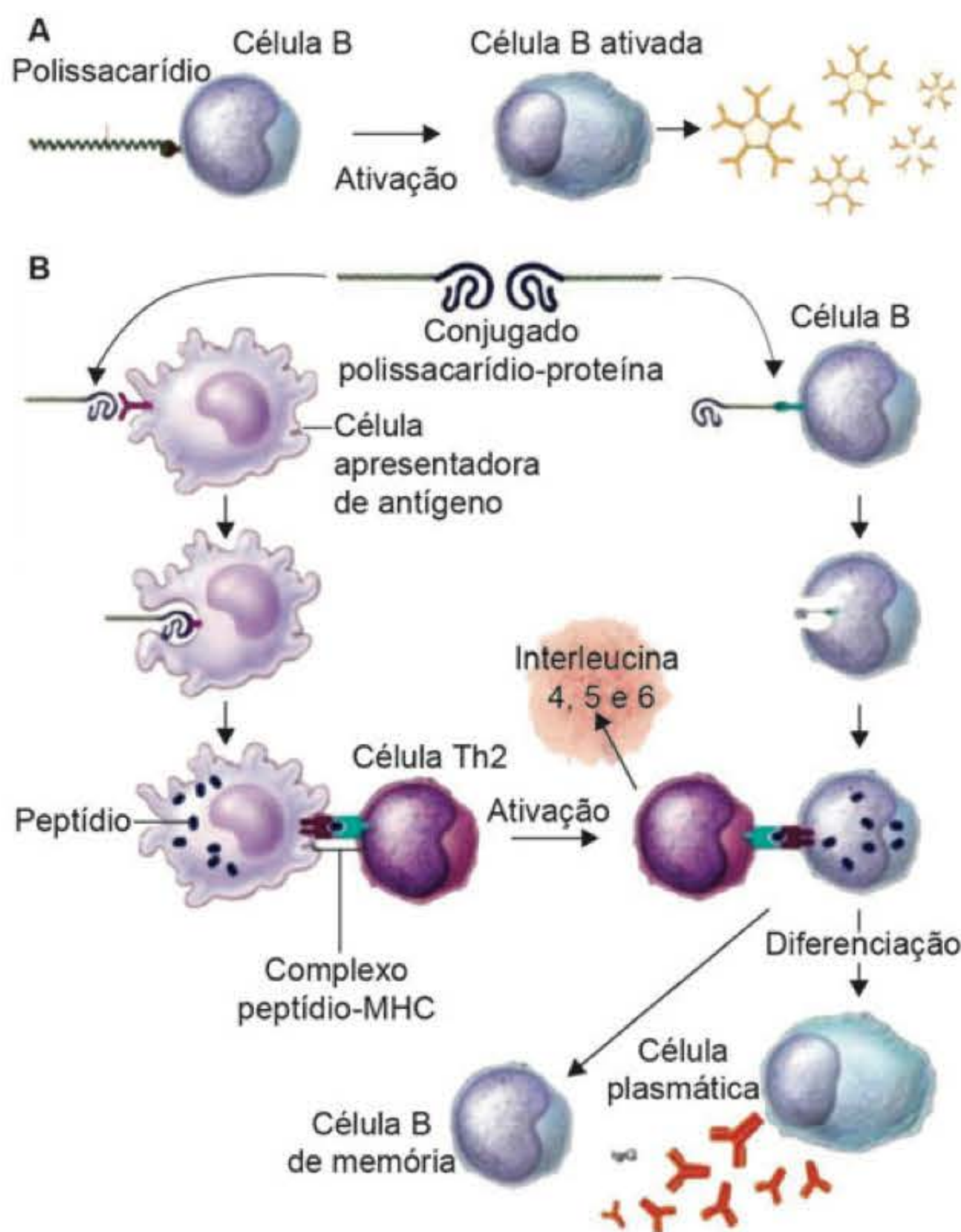
Atualmente, existem 12 modelos de vacinas contra o *S. pyogenes*, a maioria em fase pré-clínica. Os antígenos candidatos à confecção dessas vacinas têm como base a proteína M do estreptococo (regiões N e C-terminal) e outros antígenos conservados da bactéria.<sup>37</sup>

### ▪ *Streptococcus pneumoniae*

Uma vez que o ser humano é a única fonte de reserva desta bactéria, é teoricamente possível erradicar o pneumococo por meio de um programa eficiente de vacinação, assim como ocorre com alguns vírus. Há diferentes formulações de vacina pneumocócica, que variam de acordo com os sorotipos que as constitui.

A vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente (PPV23) não conjugada contém polissacarídeo capsular de 23 sorotipos que foram responsáveis pela maioria dos casos (85 a 90%) das DPI entre adultos nos EUA e países industrializados antes da introdução da vacinação. Inclui polissacarídeos dos sorotipos farmacorresistentes mais comuns.<sup>90</sup> Foi desenvolvida para prevenir a doença pneumocócica em adultos e crianças maiores de 2 anos de idade, uma vez que crianças menores não têm sistema imune desenvolvido para responder de maneira satisfatória aos antígenos polissacarídeos que compõem essa vacina. Por induzir resposta T-independente, não produz memória imunológica, com nível dos anticorpos declinando após 4 a 7 anos. Alguns estudos indicam necessidade de revacinação. Contudo, os níveis de anticorpos após revacinação podem ser menores que na primeira dose da vacina, principalmente em idosos, os quais respondem de modo menos eficiente à vacinação que adultos jovens.<sup>101,102</sup> A resposta vacinal varia conforme idade, fatores genéticos, nutricionais e situação clínica, mostrando menor efeito protetor em indivíduos imunocomprometidos.<sup>90,103,104</sup> Não conferem proteção contra otite média, não têm demonstrado reduzir a colonização mucosa pelo *S. pneumoniae*, não limitando a difusão de cepas resistentes.<sup>105</sup> Contudo, a mortalidade por infecção pneumocócica diminuiu e o tempo de internação hospitalar é menor entre indivíduos vacinados, mostrando uma evolução menos grave da doença.<sup>106</sup>

A vacina pneumocócica conjugada 7-valente (VPC7V), conjugada a uma toxina diftérica mutada, e a 13-valente



**Figura 14.3** Resposta imune a polissacarídeos bacterianos. Adaptada de Pletz et al., 2008.<sup>100</sup>



(VPC13V), conjugada à proteína D de *Haemophilus influenzae*, modificam a resposta imune contra polissacarídeos, induzindo a uma resposta T-dependente e provocando a resposta imune em crianças menores de 2 anos, com estabelecimento de memória imunológica. Levam também a uma redução da colonização da nasofaringe pelos sorotipos de pneumococos presentes na vacina,<sup>107</sup> provavelmente por induzir resposta imune na mucosa, em razão da produção de anticorpos IgA.<sup>108</sup> Este fator provoca o “efeito rebanho”, pela menor transmissão dos sorotipos vacinais às pessoas em contato com indivíduos colonizados.<sup>109</sup>

A VPC7V, porém, não contempla os sorotipos 1 e 5, prevalentes em várias regiões do mundo,<sup>110</sup> o que deu origem à nova formulação da VPC13V, testada com sucesso na República Tcheca,<sup>111</sup> sendo licenciada e aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), em 2010, nos EUA, mostrando ser tão segura quanto a vacina 7-valente.<sup>112</sup>

A vacina pneumocócica conjugada 10-valente VPC10V, conjugada com proteína D de *Haemophilus influenzae* não tipável (HiNT), difere na formulação<sup>113</sup> e inclui, além dos sorotipos da VPC7, os sorotipos 1, 5, 7F. A proteína D foi escolhida por induzir proteção contra infecção por *H. influenzae*<sup>112</sup> e por ter demonstrado eficácia na proteção contra otite média causada por *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.<sup>114</sup> Estudos de imunogenicidade cumpriram os critérios de não inferioridade para os sorotipos nela incluídos comparados com a vacina já disponível 7-valente.<sup>115</sup>

No Brasil, a vacina pneumocócica 23-valente foi incorporada pelo Programa Nacional de Imunizações no ano de 1992 e está disponível nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) para grupos com quadros clínicos específicos. A partir de 1999, passou a ser aplicada durante a Campanha Nacional de Vacinação do Idoso, visando contemplar as pessoas de 60 anos e mais que convivem em instituições fechadas. A VPC7V foi incorporada pelo Ministério da Saúde em 2001, também para grupos com condições clínicas especiais nos CRIE.

A redução do número de internações por doenças pneumocócicas (26,8%) após o ano 2000 comprova a importância dos programas vacinais instituídos. Deve-se, porém, estar alerta para o fato de a erradicação dos sorotipos vacinais estar possivelmente levando ao aparecimento de sorotipos não prevalentes antes da instituição da vacina VPC7V.<sup>116</sup> Isso pode vir a aumentar o risco de reincidência da doença e o surgimento de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos comumente usados para seu tratamento, como as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos e fluorquinolonas.<sup>117</sup> Contudo, a prevenção da doença pneumocócica por meio da vacinação continua sendo relevante.

### Agradecimento

Agradecemos as valiosas sugestões da Prof. Dra. Rosmari Horner, responsável pela disciplina Microbiologia Clínica, do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria.

## Referências bibliográficas

- Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. J Exp Med 1933; 49: 441-458.
- Spellerberg B, Brandt C. Streptococcus. Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed. Washington, DC: ASF Press 2007; 412-429 p.
- Bisno AB. Streptococcal infections In: Braun Wald E et al. Harrison's principles of internal medicine, 11<sup>th</sup> ed. New York: Mcgraw-Hill 1987: v. 1, pp. 543-550.
- Moses AE, Wessels MR, Zalcman K et al. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A. Streptococcus. Infect Immun 1997; 65:64-71.
- Alouf JE. Streptococcal toxin (Streptolysin O, Streptolysin S, Erythrogenic Toxin). Pharmacol Ther 1980; 11:661-717.
- Dick GF, Dick GH. The etiology of scarlet fever. JAMA 1924; 82:301-302.
- Kapur V, Topouzis S, Majesky MW et al. A conserved Streptococcus pyogenes extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. Microb Pathog 1993; 15:327-346.
- Tsai PJ, Kuo CF, Lin KY et al. Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. Infect Immun 1998; 66:1460-1466.
- Rikiishi H, Okamoto S, Sugawara S et al. Superantigenicity of helper T-cell mitogen (SPM-2) isolated from culture supernatants of Streptococcus pyogenes. Immunology 1997; 91:406-413.
- Kamezawa Y, Nakahara T, Nakano S et al. Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic toxin produced by a T1 strain of Streptococcus pyogenes. Infect Immun 1997; 65:3828-3833.
- Brook I, Dohar JE. Management of group A beta-hemolytic streptococcal pharyngotonsillitis in children. The Journal of Family Practice 2006; 55(12): S1-11.
- Prestes-Carneiro LE, Acêncio ESL, Pompei ACSC. Determinação de antiestreptolisina “O” e proteína C reativa entre escolares do município de Laranjal, PR. Revista Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo 2005; 38(1): 67-68.
- Maciel A, Aca IS, Lopes ACS et al. Portadores assintomáticos de infecções por Streptococcus pyogenes em duas escolas públicas na cidade de Recife, Pernambuco. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, Recife 2003; 3(1): 175-180.
- Benenson AS. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. 12<sup>a</sup> edición (1975). Publicación Científica n° 372. Organización Panamericana de la Salud 1987; p. 82-87.
- Bier O. Microbiologia e Imunologia. São Paulo: Melhoramentos 1984; p. 521-523.
- WHO – World Health Organization. Geneva Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease, 2001.
- Rosa EC, Rizzo MC, Giavina-Bianchi-Jr PF et al. Imunopatologia da febre reumática. Ciências Médicas 1988; 16:21-30.
- Ayoub EM. Immune response to Group A streptococcal infections. Pediatr Infect Dis J 1991; 10:S15-S19.
- Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone 1990, p. 1519-1538.
- Muller RE. Estudo longitudinal de pacientes portadores de cardiopatia reumática no Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Fiocruz, 2008.
- Ayoub, EM. Rheumatic Fever. In: Clinical Immunology Principles & Practice. 2<sup>nd</sup> ed. 2001. v.6 (Systemic Immune Diseases); p. 1-7.
- Cunningham MW. Pathogenesis of group A Streptococcal infections. Clinical Microbiology 2000; 13: 470-511.
- Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria 1992 (update). Special writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the young of the American Heart Association. JAMA 1992; 268(15):2069-73.
- WHO – World Health Organization. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease. World Health Organization. Geneva 2001 Oct 29 – Nov 1. Geneva: WHO; 2004.
- Veasy LG, Hill HR. Immunologic and clinical correlations in rheumatic fever and rheumatic heart disease. Pediatr Infect Dis J 1997; 16:400-407.
- Guilherme L, Cury P, Demarchi LM et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. Am J Pathol 2004 Nov; 165 (5): 1583-1591.
- Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. Scand J Immunol 2007; 66 (2-3): 199-207.
- Ayoub, EM, Hawthorne T, Miller J. Assay for antibodies to group C and group G streptococcal carbohydrate by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Med 1986; 107:204-209.
- Gupta RC, Badhwar AK, Bisno AL et al. Detection of C reactive protein, streptolysin O, and anti-streptolysin O antibodies in immune complexes isolate from the sera of patients with acute rheumatic fever. J Immunol 1986; 137:2173-2179.
- Scheftel JM, Laplanche G, Freydière MH et al. Étude de la détermination simultanée des antistreptolysines O et des antistreptodornases B au cours des infections streptococciques cutanées. Ann Dermatol Venerol (Paris) 1982; 109:1031-1036.



31. Kusama H, Ohashi M, Kobayashi S *et al.* Immunological significance of antistreptolysin O (ASL) in streptococcal infections. Sero-epidemiological studies in various age groups. *Jpn J Med Sci Biol* 1962; 15:175-187.
32. Jobim LFJ, Mendes NF, Lima AO. *Imunologia Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1980; p. 147.
33. Lawy HS. Use and interpretation of the antistreptolysin test. *Ann Rheum Dis* 1960; 19:42-47.
34. Watanabe N, Kobayashi M, Arimura A *et al.* Follow-up study of ASO, ADN-B and ASK levels in children with rheumatic fever. *Jpn Circ J* 1981; 45:1379-1381.
35. Ayoub EM, Wannamaker LW. Evaluation of the streptococcal desoxyribonuclease B and diphosphopyridine nucleotidase antibody tests in acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis. *Pediatrics* 1962; 29:527-538.
36. Machado CSM, Ortiz K, Martins ALB *et al.* Antistreptolysin O titer profile in acute rheumatic fever diagnosis. *J Pediatr (RJ)* 2001 Mar-Apr; 77 (2): 105-111.
37. Barbosa PJB, Muller RE. Diretrizes Brasileiras para o Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Febre Reumática. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93(3 supl.4): 1-18.
38. Santos AGP, Berezin EN. Comparação entre métodos clínicos e laboratoriais no diagnóstico das faringotonsilites estreptocócicas *J Pediatr* 2005;81(1):23-28.
39. Bergner-Rabinowitz S, Fleiderman S, Ferne M *et al.* The new Streptozyme test for streptococcal antibodies. Studies in the value of this multiple antigen test in glomerulonephritis, acute pharyngitis, and acute rheumatic fever. *Clin Pediatr* 1975; 14:804-809.
40. James K. Immunoserology of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:132-152.
41. Gray GC, Struwing JP, Hyams KC *et al.* Interpreting a single antistreptolysin O test: a comparison of the "upper limit of normal" and likelihood ratio methods. *J Clin Epidemiol* 1993 Oct; 46 (10): 1181-1185.
42. Todd EW. Antihaemolysin titres in haemolytic streptococcal infections and their significance in rheumatic fever. *Br J Pathol* 1932; 13:248-259.
43. Gerber MA, Caparas LS, Randolph MF. Evaluation of a new latex agglutination test for detection of streptolysin O antibodies. *J Clin Microbiol* 1990; 28:413-415.
44. Marrack JR, Richards CB. Light-scattering of the formation of aggregates in mixtures of antigen and antibody. *Immunology* 1971; 20:1019.
45. Palmeiro JK, Dalla-Costa L, Fracalanza SE *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in Southern Brazil. *J Clin Microbiol* 2010.
46. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Bultz K *et al.* Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51(RR-11):1-22. disponível em: <http://www.cdc.gov/groupbstrep/guidelines/downloads/provisional-recommendations-508.pdf>.
47. Pettersson K. Perinatal infection with Group B streptococci. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, Amsterdam 2007; 12(3): 193-197.
48. Farley MM. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis* 2001; v.33 n.4, p556-561.
49. Carvalho MHB, Bittar RE, Maganha PPAS *et al.* Incidência de colonização vaginal por *Streptococcus agalactiae* na população geral de gestantes. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2001;12(3):108-111.
50. Simoes JA, Alves VMN, Fracalanza EL *et al.* Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, Salvador 2007; 11(2): 261-266.
51. Pellegrini R. Frequência de colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes da cidade de Salvador, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32(4):451-452.
52. Borger IL, Cerqueira D, Oliveirar E, Castro ACD *et al.* *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27(10): 575-579.
53. Mitchell T J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1(3): 219-230.
54. Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(1): 102-127.
55. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 183(2): 201-207.
56. Nizet V *et al.* Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* 1996; 64(9): 3818-3826.
57. Gibson RL, Nizet V, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 1999; 45(5): 626-634.
58. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect* 2000; 2: 1733-1742.
59. Baltimore RS. Consequences of prophylaxis for group B streptococcal infections of the neonate. *Seminars in Perinatology* 2007; 31(1): 33-38.
60. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO (eds.). *Infectious disease of the fetus and newborn infant*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Mosby 1995; p. 980-1054.
61. Galask RP, Varner MW, Petzold CR. Bacterial attachment to the chorio-amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:915-918.
62. Ancona RJ, Ferrieri P, Williams PP. Maternal factors that enhance the acquisition of group B streptococci by newborn infant. *J Med Microbiol* 1980; 13:273-280.
63. Easmon CSF, Hastings MJG, Blowers A. Epidemiology of group B streptococci: one year experience in an obstetric and special care baby unit. *Br J Obstet Gynaecol* 1983; 90:241-246.
64. Platt MW, Gilson GJ. Group B streptococcal disease in the perinatal period. *Am Fam Physician* 1994; 49:434-442.
65. Baker CJ, Rensch MA, Edwards MS *et al.* Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*. *N Engl J Med* 1988; 319:1180-1220.
66. Baker CJ, Kasper DL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976; 294:753.
67. Boyer KM, Papierniak CK, Gadzala CA *et al.* Transplacental passage of IgG antibody to group B streptococcal serotype Ia. *J Pediatr* 1984; 104:618-620.
68. El Beitune P, Duarte G, Maffei CML. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. *Braz J Infect Dis*, Salvador 2005; 9(3): 276-282.
69. Kong F, Ma L, Gilbert GL. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. *Journal of Medical Microbiology*, Edinburgh 2005; 54(12): 1133-1138.
70. Thullen JD, Ingram DL. Management of infants with suspected neonatal sepsis and a positive urine latex agglutination test for group B streptococci. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10:552-553.
71. Kiska DL, Jones MC, Mangum ME *et al.* Quality assurance study of bacterial antigen testing of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1141-1144.
72. Rabalais GP, Bronfin DR, Daum RS. Evaluation of a commercially available latex agglutination test for rapid diagnosis of group B streptococcal infection. *Pediatr Infect Dis* 1987; 6:177-181.
73. Williamson M, Fraser SH, Tilse M. Failure of the urinary group B streptococcal antigen test as a screen for neonatal sepsis. *Arch Dis Child* 1995; 73:109-111.
74. Money D, Dobson S, Cole L *et al.* An evaluation of a rapid real time polymerase chain reaction assay for detection of group B streptococcus as part of a neonatal group B streptococcus prevention strategy. *J Obstet Gynaecol Can* 2008; 30(9):770-775.
75. Greenberg DN, Ascher DP, Yoder BA *et al.* Sensitivity and specificity of rapid diagnostic tests for detection of group B streptococcal antigen in bacteremic neonates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:193-198.
76. Grassi MS, Diniz EMA, Vaz FAC. Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção neonatal precoce pelo *Streptococcus* beta hemolítico do grupo B. *Pediatrics (São Paulo)* 2001; 23(3): 232-240.
77. Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18 Suppl A:35-45.
78. Leino T, Hoti H, Syrjänen R *et al.* Clustering of serotypes in a longitudinal study of *Streptococcus pneumoniae* carriage in three day care centres. *BMC Infect Dis* 2008; 8:173.
79. Leiberman A, Dagan R, Leibovitz E *et al.* The bacteriology of nasopharynx in childhood. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 49 Suppl 1:151-153.
80. Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A *et al.* High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenza* within a day care center revealed in a longitudinal study. *J Clin Microbiol* 2008; 46:225-234.
81. Cardozo DM, Nascimento-Carvalho CM, Souza FR *et al.* Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a worldwide 2004 update. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 293-304.
82. Bogaert D, Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:144-154.
83. WHO – World Health Organization. Estimates of disease burden and cost-effectiveness. Geneva: World Health Organization 2009. Disponível em: [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/burden/Pneumo\\_hib\\_estimates/en/index2.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates/en/index2.html). Acessado em 09/11/2010.
84. Gillespie SH. Aspects of pneumococcal infections including bacterial virulence, host response and vaccination. *J. Medical Microbiol* 1989; 28:237-248.



85. Yother J. Capsules. In: Tuomanen EI, Mitchell TJ, Morrison DA, Spratt BG (eds.). *The Penumococcus*. Washington, DC: ASM 2004: 30-48.
86. Dagan LM. Changing the ecology of pneumococci with antibiotics and vaccines. In: Tuomanen EMT, Morrison DA, Spratt BG (ed.). *The Pneu-mococcus*. Washington, DC: ASM, 2004: 283-313.
87. Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL *et al.* Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis* 2003; 187:1206-1212.
88. Novak R, Tuomanen E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin. Respir Infect* 1999; 14:209-217.
89. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH *et al.* (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup> edition. Washington D.C.: ASM Press; 405-421.
90. Van Ginkel FW, McGhee JR, Watt JM *et al.* Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc natl Acad Sci USA* 2003; 100:13263-13267.
91. WHO – World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record*, N° 42, 2008; 83, 373–384. Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acessado em 05/11/2010.
92. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ *et al.* Identification of Streptococcus pneumoniae revisited. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3373-3375.
93. Lindholm L, Sarkkinen H. Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5609-5613.
94. Chudwin DS, Artrip SG, Korenblit G *et al.* Correlation of serum opsonins with *in vitro* phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1985; 50:213-217.
95. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000; 343, Part 1:37-49, Part 2: 108-117.
96. O'Brien KL, Steinhoff MC, Edwards K *et al.* Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1996 May;15(5):425-430.
97. Madoff L, Paoletti L, Tai J *et al.* Maternal immunization of mice with group B streptococcal type III polysaccharide-beta C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes. *J Clin Invest* 1994; 94:286-292.
98. Johri AK, Paoletti LC, Glaser P *et al.* Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nature Reviews Microbiology*, London 2006; 4(12): 932-942.
99. Silva LJ, Richtmann R. Vaccines under development: group B *Streptococcus*, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro 2006; 82(3 suppl): 115-124.
100. Pletz MW, Mause U, Krug N *et al.* Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 32: 199-206.
101. Töring J *et al.* Revaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and elderly persons previously treated for pneumonia. *Vaccine* 2003; 22(1):96-103.
102. O'Brien KL, Hochman M, Goldblatt D. Combined schedules of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infectious Diseases* 2007; 7(9):597-606.
103. De Vito C *et al.* A systematic review evaluating the potential for bias and the methodological quality of meta-analyses in vaccinology. *Vaccine* 2007; 25:8794-8806.
104. Moberley S *et al.* Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008; (1):CD000422.
105. Whitney CG, Farley MM, Hadler J *et al.* Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 2003; 348:1737-1746.
106. Christenson B, Lundbergh P, Hedlund J *et al.* Effects of a large-scale intervention with *influenza* and 23-valent pneumococcal vaccines in adults aged 65 years or older: a prospective study. *Lancet* 2001; 357:1008-1011.
107. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O *et al.* Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis* 2002 Apr 1; 185(7):927-936.
108. Reinert RR, Haupts S, van der Linden M *et al.* Invasive pneumococcal disease in adults in North-Rhine Westphalia, Germany, 2001–2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:985-991.
109. Schnoor M, Klante T, Beckmann M *et al.* Risk factors for community-acquired pneumonia in German adults: the impact of children in the household. *Epidemiol Infect* 2007; 135:1389-1397.
110. Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL *et al.* Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis* 2003 Apr 15; 187(8):1206-1212.
111. Prymula R, Peeters P, Chrobok V *et al.* Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D provide protection against otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and nontypable *Haemophilus influenzae*: a randomized double blind efficacy study. *Lancet* 2006; 367:740-748.
112. Yeh SH, Gurtman A, Hurley DC *et al.* Immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatrics* 2010 Sep; 126(3):e493-505.
113. Akkoyunlu M, Ruan M, Forsgren A. Distribution of protein D, an immunoglobulin D-binding protein, in *Haemophilus* strains. *Infect Immun* 1991; 59:1231-1238.
114. Janson H, Carle B, Cervin A *et al.* Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J Infect Dis* 1999; 180:737-746.
115. Vesikari T, Wysocki J, Chevallier B *et al.* Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal* April 2009; 28: S664.
116. Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010 Mar; 14(3):e197-209.
117. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W *et al.* Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006; 354:1455-1463.



## Capítulo 15

---

# Infecções por Clamídias e Chlamydófilas

*Paulo Jaconi Saraiva e  
Edna Maria Vissoci Reiche*

- Introdução, 195
- Métodos laboratoriais de diagnóstico, 200
- Interpretação e repercussão dos resultados, 204
- Bibliografia, 204



## ► Introdução

As clamídias e as clamidófilas são bactérias intracelulares obrigatórias e se dividem por fissão binária em inclusões citoplasmáticas. Pertencem à ordem Chlamydiales, família Chlamydiaceae e que, nos anos 1980, apresentava o gênero *Chlamydia*, com duas espécies distintas, a *trachomatis* e a *psittaci*. No início dos anos 1990, a análise filogenética da sequência do rRNA de 16S e 23S proporcionou informações genéticas e morfológicas que contribuíram para o reconhecimento de outros patógenos, classificados como *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia pecorum*.

Everett *et al.*, em 1999, revisaram a taxonomia da família Chlamydiaceae e propuseram uma nova divisão em dois gêneros: o antigo *Chlamydia* (C.) e o novo *Chlamydophila* (Cp.). Como consequência, o gênero *Chlamydia* continuou associado às espécies *trachomatis*, *muridarum* e *suis*, enquanto o gênero *Chlamydophila* abrigou as espécies *pneumoniae*, *psittaci*, *pecorum*, *felis*, *abortus* e *caviae*. Mesmo havendo resistências quanto à nova nomenclatura, a mesma foi oficializada, embora publicações utilizem tanto a antiga quanto a nova terminologia.

Poucas espécies da família Chlamydiaceae são patogênicas para o homem, salientando-se, entre elas, a *C. trachomatis* e as *Cp. pneumoniae* e *Cp. psittaci*, enquanto as *C. muridarum* e *C. suis*, *Cp. pecorum*, *Cp. abortus*, *Cp. felis* e *Cp. caviae* raramente estão associadas a alterações em humanos.

A *C. trachomatis* é a mais pesquisada em laboratório, responsável por manifestações clínicas decorrentes de lesões oculares, pulmonares e do trato urogenital. A infecção urogenital por *C. trachomatis* é a principal causa bacteriana de doença sexualmente transmissível (DST) nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Além disso, a DST por *C. trachomatis* é considerada um fator de risco na facilitação da transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e na progressão da neoplasia causada pelo *papilomavírus humano* (HPV).

A *Cp. pneumoniae* pode causar faringites, sinusites, pneumonias atípicas e doenças vasculares ateroscleróticas. Já a *Cp. psittaci*, transmitida principalmente por aves ornamentais, provoca a ornitose ou psitacose, doença pulmonar grave, além de processos inflamatórios do endocárdio e miocárdio.

As clamídias e clamidófilas exibem morfologia e estruturas similares às bactérias gram-negativas e, apesar de apresentarem um sistema metabólico, não produzem ATP, sendo, por esse motivo, um parasito energético que utiliza o ATP da célula hospedeira. A estrutura celular tem um envelope, composto de duas membranas trilaminares (uma externa, uma citoplasmática e uma interna) contendo DNA e RNA.

A parede desses agentes bacterianos contém um antígeno lipopolissacarídico (LPS) comum aos gêneros e que apresenta um lipídio A, característica normalmente não observada em cadeias longas de ácidos graxos e que não é encontrada em LPS de outras bactérias.

Aproximadamente 60% da constituição proteica dos antígenos é formada pela proteína principal da membrana externa (MOMP – *major outer membrane protein*), codificada pelo gene *ompA* e que apresenta antigenicidade e imunogenicidade nas principais espécies patogênicas para o homem. Outros peptídeos como *pgp3* e as proteínas de choque térmico clamidial 60 (cHSP 60) e 70 (cHSP70) também apresentam poder imunogênico espécie-específico.

Estas bactérias apresentam um ciclo de vida composto por várias formas estruturais. A partícula infectante, adaptada para vida extracelular, é o corpúsculo elementar (CE) cujas

membranas externas se ligam a proteoglicanos extracelulares como sulfato de heparana e estimulam o processo de fagocitose pelas células epiteliais hospedeiras humanas. No interior da célula, envolto pelo fagossomo, o CE começa a se desenvolver e, dentro de 6 a 8 h, transforma-se em corpo reticulado (CR), uma estrutura metabolicamente ativa e adaptada para multiplicação intracelular. Este CR subdivide-se e, em 24 h, forma corpúsculos de inclusão ou corpúsculos intermediais (CI). Finalmente, após 48 h de desenvolvimento, é completado o ciclo, com a divisão dos CR em CE, reunidos em envoltórios intracelulares e que, pelo seu crescimento e divisão, favorecem a eclosão celular, liberando os CE, com alto poder infectante para as células circunvizinhas, sendo retomado o ciclo no momento da infecção de uma nova célula com a proliferação antigênica.

## ■ Transmissão, epidemiologia e importância clínica

A transmissão oculogenital das clamídias foi reconhecida no início do século 20, quando se associava a infecção cervical materna às manifestações clínicas no recém-nascido. As mães apresentavam inclusões celulares, e as crianças, conjuntivites de inclusão. As mulheres apresentavam infecções pélvicas com leucorreia e dor, e os parceiros sexuais apresentavam contaminação uretral e número significativo de uretrites não gonocócicas.

*C. trachomatis* pode infectar uma variedade limitada de células que apresentam receptores para os CE, tais como as células colunares, cubóides e transicionais, não ciliadas, encontradas nas mucosas da uretra, do endocérvice, do endométrio, das tubas uterinas, do trato respiratório e de conjuntivas. *C. trachomatis* existe como três biovars: tracoma, linfogranuloma venéreo (LGV) e pneumonite de camundongos, sendo os dois primeiros os que causam doenças em humanos. Os biovars foram, ainda, subdivididos em sorotipos, também denominados de variantes sorológicas ou sorovares, com base nas diferenças antigênicas na MOMP. São descritos 19 sorotipos que exibem diferentes organotropismos para o tecido ocular e o trato urogenital e estão associados a doenças específicas. Os sorotipos do tracoma são 15, com características invasivas e epiteliotrópicas, que causam tracoma e cegueira (sorotipos A, B, Ba e C), ou DST (sorotipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K). Os sorotipos do LGV são 4 (L1, L2, L2a e L3) e causam doenças urogenitais mais invasivas.

Os sorotipos A, B, Ba e C foram isolados de pacientes com tracoma, que apresentavam manifestações clínicas primárias, como uma queratoconjuntivite folicular, e, no estágio tardio, a perda quase total da visão. As áreas endêmicas desses sorotipos estão situadas predominantemente na África, na Ásia e na América do Sul. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que haja cerca de 1,3 milhão de pessoas infectadas, desenvolvendo o tracoma. É transmitida em populações de alto índice de pobreza, vivendo em condições higiênicas precárias, principalmente entre membros de uma mesma família em razão de contato com secreções oculares.

Os sorotipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, e K estão associados a doenças do trato genital, mas podem desenvolver conjuntivites, principalmente em recém-nascidos de mães infectadas. A infecção é assintomática em cerca de 60% de mulheres e homens, resultando em infecções e inflamações crônicas como epididimite nos homens e salpingites, endometriose e doença inflamatória pélvica nas mulheres.



A salpingite leva a complicações do trato reprodutor, provocando quadros de gravidez ectópica e infertilidade. Infecções durante a gravidez podem causar pneumonia e conjuntivite no recém-nascido.

A infecção por esses sorotipos de *C. trachomatis*, principalmente nos homens, quando associada ao antígeno de histocompatibilidade HLA-B27, pode desencadear oligoartrites, principalmente a síndrome de Reiter. Esses antígenos de histocompatibilidade apresentam distribuição universal, sendo de alta incidência nas Américas, principalmente no Brasil, onde esses sorotipos causam infecções frequentes.

Os sorotipos L1, L2, L2a e L3 causam o LGV, uma DST que é endêmica em grande parte da África, da Ásia, da América do Sul e do Caribe, mas raramente encontrada em países e comunidades industrializadas.

As infecções por *C. trachomatis* frequentemente coexistem com outras doenças, como a gonorreia. Países desenvolvidos apresentam índices que variam de 20 a 60% de mulheres com gonorreia que são portadoras de infecção simultânea pela *C. trachomatis*, enquanto em homens heterossexuais portadores de gonococo, cerca de 25% também estão infectados pela *C. trachomatis*.

*Cp. pneumoniae* é um patógeno essencialmente humano, amplamente distribuído e que não apresenta nenhum reservatório animal; apresenta somente um sorotipo denominado TWAR, sendo uma importante causa de bronquite, pneumonia, faringite e sinusite, infecções transmitidas pessoa a pessoa por secreções respiratórias. A infecção respiratória aguda com *Cp. pneumoniae* ocorre em quase todos os indivíduos durante a vida. Estima-se que *Cp. pneumoniae* seja a causa, em média, de 10% dos casos de pneumonia adquirida comunitária e 5% dos casos de bronquite e sinusite. A maioria das infecções por *Cp. pneumoniae* é subclínica; porém, infecções pulmonares graves e alveolites linfocíticas têm sido observadas. Infecções primárias acometem crianças, mas episódios de reinfecções normalmente acometem adultos.

A infecção respiratória não resolvida causada por *Cp. pneumoniae* pode contribuir, ainda, para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas pulmonares, tais como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, para o desenvolvimento de lesões vasculares. Esta espécie está distribuída de maneira universal, com menor incidência em países desenvolvidos.

Além das infecções clamidiais agudas, *Cp. pneumoniae* tem sido associada a algumas doenças crônicas caracterizadas por inflamação, que resultam em significativo dano ao hospedeiro, incluindo aterosclerose e arterite temporal. A participação da *Cp. pneumoniae* em casos de aterosclerose tem sido descrita desde os anos 1980, com evidente associação com infarto do miocárdio. Algumas pesquisas também associam a *Cp. pneumoniae* esclerose múltipla, doença de Alzheimer e síndrome da fadiga crônica. No entanto, o papel da *Cp. pneumoniae* em todas essas associações, com exceção da aterosclerose, ainda permanece controverso.

A *Cp. psittaci* tem nos pássaros ornamentais, como periquitos e papagaios, o seu reservatório natural e pode ser transmitida aos humanos por meio da inalação de aerossóis, de secreções nasais e de material fecal contaminado dessas aves. As infecções assintomáticas de *Cp. psittaci* em humanos provocam pneumonia grave crônica, com febre alta, mialgia e hepatoesplenomegalia. Complicações cardíacas decorrentes da *Cp. psittaci* incluem endocardites. Atualmente, em razão de maior fiscalização e cuidados veterinários com as aves transmissoras, os casos de psitacoses são raros no mundo.

De acordo com a análise do gene *ompA*, *Cp. psittaci* é geneticamente a espécie mais heterogênea do gênero *Chlamydophila*. As cepas de *Cp. psittaci* são muito semelhantes quanto à virulência, crescem rapidamente em cultura celular e são classificadas em seis sorotipos aviários denominados A-F e dois sorotipos isolados de mamíferos denominados M56 e WC. Os sorotipos são relativamente hospedeiro-específicos, e todos podem ser transmitidos para os humanos e causar doença grave e óbito.

As clamidófilas associadas a outros animais como felídeos, marsupiais, ruminantes e roedores, antigamente, eram confundidas e associadas à *Cp. psittaci*, mas estudos morfológicos e genéticos possibilitaram a transferência desses agentes para suas atuais espécies, sendo classificados como *Cp. abortus*, *Cp. felis*, *Cp. pecorum* e *Cp. caviae*.

A *Cp. abortus* é endêmica em ruminantes e coloniza eficientemente a placenta. Está associada a casos de aborto e infecções em neonatos de ovelhas e bezerras. Alguns trabalhos relatam infecções em mulheres grávidas que tiveram aborto espontâneo após a exposição a esses animais infectados.

A *Cp. caviae* tem como sítio natural de infecção a conjuntiva e o trato genital do porco-da-índia e de hamsters. Apresenta cinco sorotipos virtualmente idênticos, tendo a cepa G11c como a prevalente em todos eles e de maior antigenicidade e imunogenicidade. Pode ser encontrada em ratos e coelhos, mas não há relatos de infecções em humanos.

O gato doméstico é o maior reservatório de *Cp. felis*, que provoca, nesta espécie animal, quadros de conjuntivite, rinite e problemas respiratórios. Pode causar também alterações no trato gastrointestinal e trato reprodutor de outros felídeos selvagens. Infecções em humanos não foram relatadas.

A *Cp. pecorum* ocorre em bovinos e ovinos, é resistente a sulfadiazepina, apresenta formas densas e ovaladas em culturas de células, com CE e CR morfológicamente semelhantes aos de *Cp. psittaci*. Provoca alterações importantes no sistema nervoso central, respiratório e digestivo de bovinos; há estudos que mostram a possibilidade de esta espécie também infectar o homem.

## ■ Patogenia

As células da mucosa epitelial, especialmente dos tecidos ocular, trato respiratório e urogenital, são os principais alvos durante uma infecção clamidial. A entrada do microrganismo ou de seus componentes imunopatogênicos ocorre via diferentes receptores encontrados na superfície da célula do hospedeiro que desempenham importante papel como receptores de reconhecimento padrão (PRR – *pattern recognition receptors*) para *Chlamydia*. Os PRR incluem o receptor de manose para as proteínas glicosiladas como as MOMP, o receptor de Fc de imunoglobulina para as clamídias recobertas com anticorpos específicos, proteoglicanos de sulfato de heparana e os receptores *toll-like* (TLR) expressos em macrófagos, monócitos e células dendríticas que representam sítios importantes da interação patógeno-hospedeiro.

Durante a transição de CE para CR, antes da síntese da MOMP, duas chaperonas são sintetizadas: a cHSP60 e a cHSP70. Diferentemente do LPS, que é liberado da inclusão para a superfície da célula infectada, as cHSP60 e cHSP70 permanecem no interior da inclusão durante o curso de ciclo de desenvolvimento. Tem sido demonstrado que a cHSP60 induz intensa inflamação mononuclear por meio do TLR4 e da molécula CD14 expressa em monócitos e macrófagos. A cHSP60 provocaria uma resposta de hipersensibilidade tardia que levaria ao processo de fibrose após a infecção clamidial.



Os componentes clamidiais como LPS e cHSP60 parecem ser reconhecidos pelo TLR4, já os microrganismos intactos estimulam as células da resposta inata via TLR2. Enquanto o papel individual dos diferentes TLR como o TLR2, TLR4 e TLR9 na infecção clamidial está sendo delineado, estudos têm demonstrado o essencial papel da molécula intracelular adaptadora dos TLR como a MyD88 na geração da resposta imune na infecção por *Chlamydia*.

Os sorotipos ocular e genital da *C. trachomatis* exibem diferente organotropismo. O tropismo tecido-específico está correlacionado com a presença ou ausência de uma enzima funcional triptofano sintase e um domínio inativador de GTPase presente no gene da toxina clamidial. Esses genes podem ser os fatores primários responsáveis pelo organotropismo da doença clamidial.

A infecção crônica de células da mucosa genital por *C. trachomatis* pode ascender para o útero e infectar células trofoblásticas, o que poderia comprometer suas funções. Durante a infecção de uma linhagem de células trofoblásticas humanas, *C. trachomatis* sorotipo D aumenta a liberação de cHSP60, induz alteração na biossíntese de colesterol (o precursor dos hormônios esteroides) e diminui a biossíntese de estrógeno, progesterona e gonadotrofina coriônica humana (HCG). Essas alterações hormonais comprometem significativamente a relação materno-fetal e podem estar envolvidas na indução do aborto pela clamídia. O declínio de HCG poderia ocorrer pela competição entre as células trofoblásticas e a *C. trachomatis* na utilização da cisteína para a síntese de HCG e MOMP, respectivamente, uma vez que as duas moléculas apresentam um grande número de unidades de cisteína na sua estrutura proteica.

*C. pneumoniae* infecta células da mucosa oral e nasal, podendo disseminar-se do local de infecção inicial e atingir outros tecidos, sendo que os agentes da disseminação parecem ser os monócitos e macrófagos. Na infecção do trato respiratório, as células epiteliais são as primeiras que entram em contato com *C. pneumoniae*. Além das células epiteliais, monócitos, macrófagos, células do músculo liso, células endoteliais e diferentes linhagens celulares, como células HEp-2, HeLa-299 e BEAS-2B, têm demonstrado suscetibilidade para a infecção por *C. pneumoniae*. O microrganismo resiste e se replica dentro destas células e induz uma importante ativação da resposta pró-inflamatória, com a liberação de citocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão. Um complexo ciclo de crescimento clamidial é iniciado após o CE infeccioso ligar-se a uma célula-alvo suscetível, promovendo a entrada na vesícula fagocítica derivada da célula do hospedeiro. A molécula de glicosamina semelhante ao sulfato de heparana (GAG) atua como um possível receptor, mediando o ataque inicial de *C. pneumoniae*.

Estudos têm sugerido que, na reação inflamatória aguda, as próprias células epiteliais do trato respiratório desempenham um importante papel ativo com a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios. A infecção de células epiteliais brônquicas pela *C. pneumoniae* desencadeia uma cascata de sinalização pró-inflamatória que envolve a ativação do fator nuclear de transcrição NF- $\kappa$ B via p38 MAPK, resultando na liberação de GM-CSF pelas células infectadas. Outros mediadores liberados são interleucina 6 (IL-6), IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico e o metabólito oxidativo do ácido araquidônico, ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE). Estudos demonstraram que a expressão de GM-CSF pelas células epiteliais brônquicas foi dependente de fatores termolábeis expressos pela *C. pneumoniae*, tais como as MOMP ou

a cHSP60, e que patógenos mortos ou aquecidos foram menos efetivos na liberação da citocina.

A associação entre *C. pneumoniae* e aterosclerose foi evidenciada pela demonstração do microrganismo em amostras de biopsias de lesões ateroscleróticas pelos métodos de cultura, amplificação do ácido nucleico por reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), coloração imuno-histoquímica, microscopia eletrônica e hibridização *in situ*. Na lesão aterosclerótica, os microrganismos têm sido detectados nas células endoteliais, nas células espumosas derivadas de macrófagos e nas células do músculo liso, uma característica da formação da lesão inicial. Acredita-se que seu papel na patogênese da aterosclerose seja resultado de uma resposta inflamatória contra a infecção clamidial crônica.

Estudos *in vivo* em modelos animais e *in vitro*, em cultura de tecidos, demonstraram que *C. pneumoniae* dissemina via monócitos e macrófagos infectados e que macrófagos podem transmitir a infecção diretamente para as células endoteliais. A infecção de macrófagos por *C. pneumoniae* é um fator crucial para disseminação e estabelecimento da infecção persistente na placa de ateroma e para a exacerbação da progressão da lesão aterosclerótica.

Inúmeros estudos foram realizados para identificar os mecanismos pelos quais a *C. pneumoniae* pode alterar as propriedades hemodinâmicas da parede vascular. A *C. pneumoniae* tem a membrana externa rica em fosfolipídios, o que pode induzir à oxidação da membrana celular do hospedeiro, quando lesada. O processo inflamatório desencadeado pela infecção clamidial resultaria em debris de membranas celulares da bactéria e das células do hospedeiro, com acúmulo de lipoproteínas oxidadas.

Experimentos *in vitro* identificaram que o LPS é o componente da *C. pneumoniae* que induz a formação de células espumosas em macrófagos expostos à lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada. A cHSP60 seria o componente que promove a oxidação da LDL à sua forma pró-aterogênica e que estimula a síntese de metaloproteinases (MMP) pelos macrófagos, causando danos nos componentes da matriz extracelular, enfraquecimento das placas ateroscleróticas, tornando-as mais suscetíveis à ruptura. A aterosclerose é um processo multifatorial; a infecção por *C. pneumoniae* seria um cofator de risco juntamente com hiperlipidemia, e os efeitos aterogênicos da infecção seriam dependentes da presença de hiperlipidemia.

A infecção de monócitos e macrófagos por *C. pneumoniae* desencadeia a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e a produção do fator tecidual, uma potente molécula pró-trombótica que desempenha um papel na formação do trombo após a ruptura da placa de ateroma. Além das citocinas produzidas pelas células do sistema fagocitário monocítico, as células endoteliais infectadas por *C. pneumoniae* induzem o aumento da expressão de, aproximadamente, 20 genes após 2 h de infecção; dentre eles, genes que codificam moléculas com atividades pró-inflamatórias e pró-coagulantes que são consistentes com o processo de aterosclerose como IL-1, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), IL-8, fatores de crescimento celular, fator de crescimento derivado de plaquetas, quinases intracelulares, receptores de superfície com sinal de transdução e moléculas envolvidas com a adesão de leucócitos e a diapedese.

A *Cp. psittaci* forma a inclusão clamidial dentro da célula do epitélio pulmonar onde CE infectantes são liberados para outras células do hospedeiro, geralmente após causar a morte da célula infectada. Ocorre disseminação hematogênica, o



que resulta em uma resposta inflamatória predominantemente linfocítica nos espaços alveolares e intersticiais. Nesses locais, ocorre edema, infiltrado de macrófagos, espessamento da parede alveolar, necrose e, ocasionalmente, hemorragia. Tampões mucosos se desenvolvem nos bronquíolos, provocando cianose e anoxia. A partir do trato respiratório, ocorre a disseminação do microrganismo para as células do sistema fagocítico mononuclear do fígado e baço, provocando necrose focal. O coração e o trato gastrointestinal também podem ser afetados.

O período de incubação é de 5 a 14 dias, e as infecções humanas podem variar de assintomáticas ou leves a casos fatais em pacientes não tratados. Geralmente, a infecção se inicia com sintomas semelhantes aos da gripe, com febre alta, baixa pulsação, calafrios, cefaleia, mialgia, tosse não produtiva e dificuldade respiratória; posteriormente, pode evoluir para um quadro de pneumonia grave. Outros sintomas descritos são *rash* inespecífico e problemas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Raramente, ocorrem complicações sistêmicas como miocardite, endocardite, hepatomegalia e esplenomegalia. O sistema nervoso central pode ser afetado por manifestações clínicas leves, como cefaleia, e graves, como encefalite, convulsões, coma e morte, nos casos não tratados. Outras manifestações clínicas têm sido associadas à infecção por *C. psittaci*, tais como aborto e artrite. Em gestantes, a *Cp. psittaci* pode causar pneumonia atípica, hepatite, insuficiência renal, sepse, parto prematuro e morte fetal.

## ▪ Resposta imune inata e adaptativa e mecanismos de evasão

Após a infecção por clamídias e clamidófilas, as células epiteliais produzem uma variedade de mediadores proinflamatórios tanto pela infecção direta das células epiteliais das superfícies mucosas do organismo como pela interação com células do sistema imune. Entre os mediadores produzidos incluem os ligantes de quimiocinas CXC (CXCL1, CXCL8 ou IL-8, CXCL10 e CXCL16), GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Células epiteliais infectadas também aumentam a expressão do ligante 5 de quimiocinas CC (CCL5) e das citocinas que promovem a produção de interferona gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-12. Fibroblastos infectados secretam IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e óxido nítrico, enquanto macrófagos produzem TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Muitos desses mediadores têm o papel de polarizar a resposta imune contra as clamídias e clamidófilas em direção a uma resposta protetora tipo Th1. Todos esses mediadores desencadeiam uma resposta inflamatória e promovem o recrutamento de células imunes ao local da infecção, contribuindo para o desenvolvimento das respostas inata e adaptativa. As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-10, no entanto, podem estar envolvidas nos processos patológicos associados à infecção por esses microrganismos.

Estudos desenvolvidos em modelos de infecção em murinos e não primatas, assim como em populações de pacientes infectados, apontam os linfócitos T CD4+ como os principais mediadores da imunidade na identificação e resolução da infecção clamidial. As células T CD8+ apresentam um papel limitado na infecção por clamídias e clamidófilas. Em algumas situações, as células T CD8+ podem ser importantes para a eliminação das células infectadas por clamídias por um mecanismo que envolve a produção de IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  é um fator imunorregulatório crítico na aquisição e resolução da infecção clamidial, acelerando o desenvolvi-

mento da clamídia na célula epitelial. A diminuição da IL-2 acompanhada pelo aumento da produção de IL-12 após a infecção genital pode comprometer a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1 e, portanto, prejudicar a resposta imune mediada por células na mucosa genital, como já relatado na cervicite clamidial. A diminuição da resposta local de células T e produção de IFN- $\gamma$  poderia promover a infecção latente por *C. trachomatis* e a inflamação. IFN- $\gamma$  exerce seu efeito inibidor do crescimento clamidial por vários mecanismos. Em células epiteliais humanas, IFN- $\gamma$  induz a síntese da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano intracelular, inibindo o crescimento de clamídias pela depleção do *pool* de triptofano. Outros efeitos inibitórios incluem diminuição da expressão de receptor da transferrina com diminuição do ferro livre, aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para a síntese de óxido nítrico, aumento da expressão de moléculas de adesão e de moléculas MHC classe II na superfície das células epiteliais, indução da secreção de citocinas e regulação das atividades de células T. Elevada concentração de IFN- $\gamma$  bloqueia o crescimento clamidial *in vitro*, enquanto baixa concentração pode induzir o desenvolvimento de CR não infectantes aberrantes. *In vitro*, estes CR aberrantes persistem na célula do hospedeiro por longo intervalo de tempo e reativam em organismos viáveis após a remoção de IFN- $\gamma$ .

A resposta imune contra a *C. trachomatis* é muito complexa; ao mesmo tempo que ocorrem clareamento da infecção e proteção de curta duração, o hospedeiro é sensibilizado para o desenvolvimento de alterações imunopatológicas. Algumas evidências *in vitro* e *in vivo* indicam que a resposta imune constitui um importante componente na patogenia do processo lesivo produzido pelas clamídias. Em mulheres, a infecção clamidial é geralmente assintomática, e reinfecções subsequentes levam a uma resposta inflamatória com sequelas patológicas. Há evidências que apontam o antígeno MOMP como o responsável pela estimulação da inflamação mediada pela resposta imune. A proliferação de linfócitos frente aos antígenos clamidiais, incluindo MOMP e cHSP60, está aumentada em indivíduos que espontaneamente resolvem a infecção quando comparados com aqueles com infecção persistente.

A deprivação de ferro é um mecanismo de defesa contra infecção clamidial e um modelo utilizado para o estudo *in vitro* da persistência da infecção. A exposição de células do epitélio endometrial infectadas com *C. trachomatis* sorotipo E a um composto quelante de ferro inibiu a infectividade e causou significativa alteração morfológica nas clamídias. A adição de transferrina saturada de ferro levou à recuperação da infectividade e ao desenvolvimento produtivo da *C. trachomatis*. Estes dados suportam a hipótese de que níveis flutuantes de ferro, por exemplo, sob influência do estradiol no tecido endometrial, podem contribuir para o resultado da infecção clamidial *in vivo*.

Em razão das características genotípicas, os sorotipos oculotrópicos são muito mais sensíveis a IFN- $\gamma$  do que os genitotrópicos, sugerindo que o gene *trpBA* (biossíntese do triptofano) possa desempenhar um papel na diferença de sensibilidade a IFN- $\gamma$ . Com exceção do sorotipo B, o qual não contém o operon *trpBA*, cepas de *C. trachomatis* oculotrópicas (A-C e Ba) apresentam a mutação específica no gene do triptofano sintase. *C. trachomatis* oculotrópica (sorotipo A/HAR-13) apresenta um gene *tyrP* (transporte do triptofano) intacto e um gene *trpBA* (biossíntese do triptofano) não funcional, o que resulta na ausência de expressão da enzima funcional triptofano sintase. Já a *C. trachomatis* genitotrópica



(D-K e L1-L3) contém duas cópias intactas do gene *tyrP* e o gene *trpRBA* funcional, o que resulta na expressão de uma enzima funcional triptofano sintase.

A síntese de uma enzima funcional triptofano sintase está também estritamente associada à habilidade de cepas genitais serem recuperadas com indol exógeno. A habilidade de sintetizar triptofano a partir de indol pode ser um importante mecanismo que torna possível às cepas genitais escaparem da atividade da IDO induzida por IFN- $\gamma$ . Como as células humanas e as clamídias não sintetizam indol, a fonte mais provável para este componente parece ser proveniente da flora do trato genital feminino. Os lactobacilos, microrganismos predominantes na flora vaginal, não produzem indol; no entanto, outros microrganismos da flora, incluindo espécies de *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Bacterioides* e *Escherichia coli*, produzem indol. De modo interessante, estes microrganismos produtores de indol estão aumentados na mulher com vaginose bacteriana e poderiam ser a fonte exógena de indol para o crescimento clamidial. A coinfeção com *C. trachomatis* durante a vaginose é comum e aumenta significativamente a incidência de complicações secundárias da infecção clamidial, incluindo a doença inflamatória pélvica. A evolução das cepas genitais para a utilização de indol na síntese do triptofano representa uma estratégia de evasão da resposta imune, uma vez que estes sorotipos apresentam maior probabilidade de sobreviverem *in vivo* sob a pressão de IFN- $\gamma$ , sendo a enzima triptofano sintase um importante fator de virulência para as cepas genitais, mas não para as cepas oculares.

Nos casos de infecção clamidial ocular, células da mucosa da conjuntiva de pacientes com tracoma apresentaram aumento da expressão dos genes *IL-10* e *FOXP3* na mucosa da conjuntiva, e a elevação dos níveis séricos de IL-10 tem sido associada ao processo de cicatrização e cegueira. O aumento de células Treg FOXP3<sup>+</sup> no local da infecção clamidial com a excessiva secreção de IL-10 pode levar à eliminação incompleta da clamídia ou ao desenvolvimento de um estado de anergia que resulta no desenvolvimento das complicações das infecções clamidiais que ocorrem no trato geniturinário ou ocular.

Após a eliminação da *C. trachomatis*, a retenção de linfócitos T (LT) na mucosa leva a uma resposta de memória local, que, na presença do antígeno, produzirá resposta secundária e diminuição da duração da infecção subsequente.

Os indivíduos infectados com *C. trachomatis* desenvolvem uma resposta imune humoral, que é, provavelmente, pouco eficaz na defesa contra este microrganismo em seu *habitat* intracelular. Após a infecção inicial com um sorotipo, a maioria das reinfecções é causada por um sorotipo diferente, sugerindo que a imunidade à *C. trachomatis* é sorotipo-específica. Isso é particularmente aparente para a resposta de anticorpos, que, predominantemente, têm como alvo as MOMP, e são, portanto, sorotipo-específicos. Os anticorpos das classes IgG e IgA específicos contra MOMP são os mais frequentemente encontrados no soro de mulheres e homens com uretrite e de mulheres com cervicite. A elevação nos níveis de anticorpos séricos contra MOMP da *C. trachomatis*, geralmente, tem sido observada em mulheres com infecções complicadas do trato genital, como a doença inflamatória pélvica.

A cHSP60 induz a produção de altos títulos de anticorpos que se correlacionam com a gravidade das sequelas da infecção pela *C. trachomatis* tanto na mucosa ocular como no trato genital. São encontrados títulos elevados de anticorpos contra a cHSP60 em pacientes com tracoma e em mulheres com fibrose tubária após doença inflamatória pélvica. IFN- $\gamma$  interfere no ciclo de desenvolvimento clamidial e leva à infecção

persistente com liberação contínua de cHSP60. No entanto, não está claro se a resposta imune contra cHSP60, por si só, seria a causa das lesões imunopatológicas ou se os anticorpos anticHSP60 seriam somente marcadores de maior gravidade ou de infecção prolongada.

A IgA encontrada no trato genital é produzida localmente pelas células plasmáticas e também transportada a partir do plasma circulante. Diferentemente de outros locais de mucosas, é encontrada uma proporção igual de IgA1 e IgA2 nas secreções da mucosa do trato genital, sendo a IgA2 mais funcionalmente ativa por ser resistente às proteases de IgA secretadas por patógenos do trato genital.

A importância dos anticorpos na imunidade contra *C. trachomatis* foi indicada por estudos epidemiológicos que demonstraram correlação inversa entre a quantidade de IgA na secreção cervical e a quantidade de *C. trachomatis* recuperada da cérvix de mulheres infectadas.

A função mais importante dos anticorpos é o aumento da resposta imune mediada pelos LTh1 durante a reinfecção dependente dos receptores Fc expressos nas APC. A fagocitose de imunocomplexos mediada pelo receptor Fc resulta no aumento da apresentação de antígenos para as células T. A presença de anticorpos anti-MOMP aumenta a ativação de LTh1 pelas APC que expressam receptor Fc, o que resulta no aumento da produção de IFN- $\gamma$  pelos LTh1 ativados. Anticorpos contra a IgG2a bloqueiam o aumento da ativação de LTh1, o que demonstra que esta classe de imunoglobulina desempenha um papel importante na resposta imune frente às clamídias. Na presença de anticorpos anticlamídia IgG2a, os CE clamidiais são opsonizados pelas células dendríticas que contêm o receptor para Fc. Após a migração para o linfonodo regional, ocorrem rápidas proliferação e ativação de células LTh1. Entretanto, grande parte da estratégia de sobrevivência intracelular da *C. trachomatis* envolve a formação da inclusão clamidial, que propicia um local protegido que limita a ação dos anticorpos e dentro do qual elas se replicam. Outro mecanismo que aumenta a sobrevivência da clamídia na célula do hospedeiro é a inibição da liberação da citocromo *c* mitocondrial necessária para a apoptose das células infectadas mediada pela caspase-9. *C. trachomatis* escapa do reconhecimento imunológico pela inibição da expressão das moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na superfície das células infectadas. A liberação de uma proteína clamidial denominada *Chlamydia protease/proteasome-like activity factor* (CPAF) no citoplasma da célula do hospedeiro com atividade proteolítica promove a degradação dos fatores de transcrição das moléculas MHC na célula infectada.

A resposta imune contra *C. pneumoniae* desenvolve-se em dois estágios: (1) uma resposta inicial que requer a produção de IFN- $\gamma$  para limitar o crescimento da bactéria intracelular e que desempenha um papel central no controle inato da infecção; (2) uma resposta imune adaptativa posterior que envolve linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> na eliminação da bactéria e proteção. Embora a resposta imune primária seja desenvolvida para eliminar a infecção primária do hospedeiro e proteger contra a reinfecção com o mesmo patógeno, a lesão tecidual também ocorre, e a infecção clamidial geralmente é recorrente ou persistente, podendo causar graves consequências.

A *C. pneumoniae*, após ser internalizada pelos macrófagos e outras células fagocitárias, onde sobrevivem e replicam, induz a produção de IFN- $\gamma$  em células NK, LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>. Nos macrófagos, IFN- $\gamma$  age em sinergismo com os produtos bacterianos para ativação de vários mecanismos microbicidas, como a expressão da iNOS, que leva à produção



de óxido nítrico que, por sua vez, inibe o crescimento clamidial. Moléculas derivadas da *C. pneumoniae* são detectadas por vários PRR, especialmente TLR2 e TLR4. TLR4 reconhece componentes clamidiais como o LPS e a cHSP60, e o microrganismo intacto estimula as respostas mediadas por TLR2 e TLR4. A sinalização mediada pelo TLR desencadeada pelas moléculas derivadas da *C. pneumoniae* induz o desenvolvimento de uma resposta imune inata inflamatória, e a sinalização TLR/MyD88 desempenha um papel importante na defesa contra a infecção por *C. pneumoniae*.

Quanto aos genes envolvidos no metabolismo do triptofano, *C. pneumoniae* contém de um a três genes *tyrP* (transporte do triptofano) intactos, mas não apresenta o óperon *trpBA* (biossíntese do triptofano) no seu genoma, o que resulta na ausência de expressão da enzima funcional triptofano sintase. No entanto, este microrganismo pode ter uma estratégia alternativa para driblar os efeitos da atividade da IDO, expressa em resposta a IFN- $\gamma$ . Estudos demonstraram que cepas respiratórias de *C. pneumoniae* apresentam múltiplas cópias do gene *tyrP*, que codifica a enzima permease tirosina-triptofano, enquanto cepas vasculares codificam somente uma cópia. Uma vez que a presença de cópias extras de *tyrP* estão correlacionadas a aumento dos níveis de mRNA e maior captação do substrato tirosina pelas cepas respiratórias, formulou-se a hipótese de que uma capacidade reduzida para o transporte de aminoácidos poderia contribuir para maior tendência das cepas vasculares tornarem-se persistentes *in vivo*.

Quanto aos genes envolvidos no metabolismo do triptofano, *Cp. psittaci* cepa GPIC contém um gene *tyrP* (transporte do triptofano) intacto e o gene *trpRDCFBA* (biossíntese do triptofano), o que resulta na expressão da enzima funcional triptofano sintase.

## ► Métodos laboratoriais de diagnóstico

Como os gêneros clamídia e clamidófila apresentam uma diversidade de espécies e sorotipos, ocorre um número significativo de diferentes sinais e sintomas clínicos, fazendo com que vários métodos laboratoriais sejam acionados para identificá-los e tentar definir o tipo e gravidade da infecção no indivíduo.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial de infecções por clamídias e clamidófilas inclui uma gama variada de métodos, que apresentam vantagens e desvantagens quanto a sensibilidade e especificidade, com reflexos na taxa de probabilidade de excluir ou confirmar a doença.

Métodos diretos e indiretos são utilizados, com vários protocolos em nível internacional que definem o tipo de material biológico para cada analito a ser determinado. Vários manuais determinam o tipo de amostra, o volume mínimo, a estabilidade do agente, o melhor meio de armazenamento e o transporte. A definição de padrões operacionais e padrão de coleta deve contar com todas as informações necessárias para que este processo pré-analítico seja cumprido dentro das normas estabelecidas para um determinado teste.

Métodos diretos e indiretos, que pesquisam antígenos e quantificam anticorpos, respectivamente, compõem o acervo diagnóstico de clamídias e clamidófilas, e as opções encontradas para a pesquisa do antígeno incluem as culturas, as técnicas citológicas com variados métodos de coloração, as reações de imunofluorescência direta e indireta e métodos imunoenzimáticos. Atualmente, a detecção do ácido nucleico do micro-

organismo com o emprego de métodos moleculares que incluem amplificação de ácidos nucleicos e sondas de DNA são os mais utilizados.

## ■ Identificação direta

### Culturas

As Chlamydiaceae podem ser isoladas em culturas de tecidos com a utilização de células de linhagem McCoy, Hela 22a, HEp2, BGMK e outras que conferem alta especificidade ao teste, sendo considerado o padrão de referência para o diagnóstico das diferentes espécies.

O procedimento de cultivo é realizado em 3 dias de incubação, após os quais as inclusões citoplasmáticas desenvolvidas no interior das monocamadas celulares poderão ser coradas por iodo, Giemsa ou ainda por anticorpos monoclonais conjugados a substâncias fluorescentes, específicos contra a MOMP ou outra estrutura clamidial.

A cultura é o único método com base na detecção do microrganismo vivo. Portanto, para o sucesso da investigação, deverão ser observados alguns fatores pré-analíticos como o tempo entre a coleta do material e o processamento do espécime no laboratório. Se o material for processado em poucas horas, o mesmo poderá ser mantido à temperatura de 4 a 8°C. Se for processado em até 24 h, deverá ser mantido em meio de transporte específico e em ambiente refrigerado. Entretanto, se o material biológico for semeado após 24 h, é indicado estocá-lo a -70°C no meio de manutenção apropriado. O *swab* de coleta poderá interferir no desenvolvimento e crescimento do agente etiológico; o *swab* produzido com alginato de cálcio poderá inibir o crescimento das clamídias, não sendo recomendado para este tipo de pesquisa.

Apesar da alta especificidade do teste de cultura, principalmente para a *C. trachomatis*, algumas restrições quanto a sua utilização são levantadas. O tempo para a obtenção do resultado e o fato de detectar apenas bactérias vivas, muitas vezes pela viabilidade das mesmas ter sido prejudicada pelas situações inadequadas de coleta, armazenamento e transporte, com diminuição da sensibilidade em até 70%, tem restringido o uso de culturas em rotinas laboratoriais.

### Análise citológica

Células epiteliais são obtidas das conjuntivas, uretra ou cérvix, utilizando-se *swabs*, espátulas e outros materiais de coleta adequados. Os esfregaços são fixados em lâmina de vidro com metanol ou acetona, secos ao ar e corados. Como métodos de coloração mais utilizados, o Giemsa é útil no diagnóstico nos casos de conjuntivite de inclusão de recém-nascidos e casos de tracoma, mas é pouco sensível e, por isso, desaconselhável para a avaliação de conjuntivite em adultos e infecções do trato urogenital.

Quando comparado à cultura, a análise citológica é mais rápida e conveniente quanto ao transporte e conservação, mas é um teste de leitura subjetiva, requer experiência e sensibilidade do profissional e exige tempo maior para a análise de um grande número de amostras.

### Imunofluorescência direta

Materiais coletados de conjuntiva, uretra, cérvix, bem como o primeiro jato de urina matinal, são fixados com metanol, em lâminas de vidro, e são utilizados para a pesquisa direta de antígenos clamidiais, que utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo contra o epitopo MOMP de *C. tra-*



*chomatis*, principal agente investigado por este método. Torna possível identificar os CE intra e extracelulares com uma sensibilidade de 85% quando comparado ao padrão de referência, que é a cultura, além de apresentar uma especificidade de 95% graças ao anticorpo monoclonal utilizado. É um teste rápido, que exige microscópio específico de imunofluorescência, com fonte excitadora de no mínimo 100 watts e experiência do profissional. Apesar da especificidade, reações cruzadas podem ocorrer com antígenos LPS encontrados em outras clamídias, clamidófilas e outros microrganismos, provocando resultados falso-positivos. Quando comparada às técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, a sensibilidade da imunofluorescência direta é menor, mas a vantagem é que o teste fluorescente é mais rápido e mais exequível economicamente.

### Enzimaimunoensaio direto

Os testes com base no método de enzimaimunoensaio para a detecção de *C. trachomatis* utilizam anticorpos monoclonais, ligados à fase sólida, específicos para o antígeno LPS, que são mais solúveis que os relacionados com MOMP. Apesar de este teste ser capaz de detectar *Cp. pneumoniae* e *Cp. psittaci*, tem sido pouco utilizado para a identificação desses agentes.

Considerando a cultura como teste padrão de referência, a sensibilidade do enzimaimunoensaio, realizado com raspado endocervical ou secreção ocular, apresenta um índice de 75% de sensibilidade e 90% de especificidade, apesar dos resultados falso-positivos, que ocorrem em razão de reações com a fração homóloga de LPS de outros microrganismos, como *Acinetobacter*, *Gardnerella*, *Salmonella*, e algumas enterobactérias. Para alcançar este grau de especificidade, são recomendados testes confirmatórios que empregam anticorpos bloqueadores.

Apesar do baixo custo e da possibilidade de automação, o enzimaimunoensaio direto não é recomendado para análise de materiais biológicos, como esperma, urina e secreções vulvovaginais.

Os testes imunoenzimáticos rápidos, denominados *point-of-care*, têm sido utilizados em consultórios médicos, principalmente para pesquisa em mulheres; no entanto, como usam anticorpos apenas contra a fração LPS, apresentam grande número de resultados falso-positivos com outras bactérias gram-negativas. O teste não é recomendado para laboratórios clínicos, a não ser como triagem para posterior confirmação com métodos mais específicos como os que utilizam amplificação ou hibridização de ácidos nucleicos.

### ■ Métodos indiretos

Quanto à pesquisa e à quantificação de anticorpos específicos, processo indireto de investigação do patógeno, as classes de imunoglobulinas são utilizadas de maneiras isoladas para definir a possível infecção e o estágio de desenvolvimento da mesma. Reações de fixação do complemento, microimunofluorescência, imunofluorescência indireta e métodos imunoenzimáticos compõem o arsenal de possibilidades diagnósticas indiretas. Nesses métodos, definidos como análise sorológica, as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM são os componentes principais da avaliação.

### Reação de fixação do complemento

Teste qualitativo ou semiquantitativo com base na identificação de anticorpos totais contra os antígenos LPS das clamídias e clamidófilas. Aplicado para o diagnóstico de LGV, que, quando o processo infeccioso está presente, apresenta valores

semiquantitativos iguais ou superiores a 1:256. Títulos iguais ou inferiores a 1:32 poderão estar associados a reações cruzadas com outros antígenos ou configurar um processo infeccioso agudo. Neste caso, se houver sintomatologia, é indicada a coleta de nova amostra no período de 10 a 15 dias e a realização de nova dosagem. Havendo aumento do título igual ou superior a 4 vezes o valor inicial, deve ser interpretado como infecção em desenvolvimento, passível de protocolo de tratamento para infecção em estágio inicial. Este mesmo procedimento é indicado para diagnóstico de *Cp. psittaci*, mas contraindicado para *Cp. pneumoniae*, bem como para avaliação de tracoma, conjuntivite de inclusão e doenças urogenitais provocadas pela *C. trachomatis*.

### Microimunofluorescência

A prova é desenvolvida com a utilização de CE purificados, espécies e sorotipos específicos de *C. trachomatis*, *Cp. psittaci* e *Cp. pneumoniae*, para a detecção de anticorpos específicos IgG e IgM, o que auxilia na identificação de infecções recentes ou passadas. É o teste de escolha para a avaliação de pneumonias em recém-nascidos, quando os valores de anticorpos IgM são iguais ou superiores a 1:32 para *C. trachomatis*. Os anticorpos IgG são pouco valorizados neste caso, em razão da passagem transplacentária desta classe de imunoglobulina, mascarando o resultado obtido em neonatos. Infecções genitais reversíveis dos sorotipos D a K de *C. trachomatis*, que provoca doença inflamatória pélvica e salpingites nas mulheres e epididimite nos homens, apresentam taxas elevadas de anticorpos IgG, superiores a 1:256, indicando processo inflamatório profundo e caracterizando quadros crônicos da doença. Nestes casos, normalmente as taxas de anticorpos IgM não são superiores a 1:16, não sendo detectados na sua maioria.

A microimunofluorescência pode ser utilizada para avaliar possíveis infecções pela *Cp. psittaci* e é o teste de escolha para o diagnóstico de *Cp. pneumoniae*.

Os critérios para definir infecção aguda no teste semiquantitativo indicam valores iguais a 1:16 de anticorpos IgM específicos e títulos iguais ou superiores a 1:512 de anticorpos IgG. Quando são encontrados títulos iguais ou superiores a 1:256 de IgG sem histórico ou sintomas clínicos aparentes de doença, e com IgM ausentes, deve-se ter cautela na interpretação do resultado, pois, devido a sensibilidade do teste, anticorpos residuais em altos títulos poderão persistir por vários anos, sem redução. Títulos isolados de IgG que variam entre 1:16 e 1:128 sugerem infecção passada. A pesquisa de anticorpos IgA não é indicada por microimunofluorescência como marcador diagnóstico de infecção aguda ou em fase de transição para as *Cp. psittaci* ou *Cp. pneumoniae*.

### Imunofluorescência indireta

Lâminas contendo células infectadas ou não por CE de *C. trachomatis*, sorotipo L2, possibilitam a pesquisa qualitativa ou semiquantitativa de anticorpos IgG, IgA e IgM específicos contra a clamídia. Difere de microimunofluorescência pelo antígeno empregado; nesta versão diagnóstica apenas são pesquisados anticorpos contra o gênero *Chlamydia*, não sendo possível identificar aqueles do gênero *Chlamydophila* com os produtos disponíveis no mercado.

Esta metodologia torna possível detectar separadamente as três diferentes classes de imunoglobulinas, sendo utilizada a diluição de 1:8 do soro a ser testado como triagem para os diferentes anticorpos pesquisados.

Para melhor avaliação dos resultados, é importante caracterizar as três diferentes classes de imunoglobulinas, e



os valores a serem obtidos irão variar conforme o grau de invasividade do antígeno e a resposta imunológica do hospedeiro.

Em infecções superficiais, normalmente não são encontrados anticorpos séricos; entretanto, os títulos de IgA e IgM anticlamídia, com valores de diluição entre 1:8 e 1:16, poderão ocorrer em processo agudo, na ausência da IgG. Com o desenvolvimento da infecção, muitas vezes assintomática, as taxas de anticorpos IgG e IgA tendem a aumentar e as de IgM decaem rapidamente.

Em mulheres infectadas, títulos de IgG superiores a 1:64 e de IgA superiores a 1:32 são sugestivos de processo inflamatório em desenvolvimento, porém estes valores de triagem deverão ser confirmados por testes moleculares.

No homem, valores superiores a 1:32 de IgG e a 1:16 de IgA são indícios de possível infecção em curso e, nestes casos, em geral a IgM é negativa. Quando a infecção é recorrente, as taxas de anticorpos IgG superam valores de 1:512 e as de IgA alcançam títulos superiores 1:128, sempre com IgM negativo.

Normalmente, a imunofluorescência indireta é utilizada como teste de triagem e acompanhamento de tratamento, não servindo como teste único de diagnóstico. Reações cruzadas acontecem com clamidófilas, como a *Cp. pneumoniae*, e é indicada sua realização em amostras coletadas em períodos diversos para mais bem avaliar a taxa de anticorpos e para melhor definição dos resultados.

### Enzimaimunoensaio

Método que utiliza o princípio de reação heterogênea e emprega diferentes antígenos como MOMP, LPS, cHSP60, cHSP70 e omp2, da *C. trachomatis* e *Cp. pneumoniae*, além de peptídeo pgp3, de reconhecimento específico.

Os resultados são expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) e os anticorpos pesquisados são das classes IgG, IgA e IgM. Os resultados, apesar de quantitativos, têm interpretações semelhantes às dos encontrados nos testes de imunofluorescência indireta e de microimunofluorescência. O que diferencia em termos de sensibilidade e especificidade é o uso associado de antígenos como o pgp3 e o MOMP, que conferem 75% de sensibilidade e 85% de especificidade, principalmente na pesquisa de anticorpos contra *C. trachomatis*. Quando o antígeno omp2 é utilizado em associação a outros peptídeos, a sensibilidade não se altera, mas a especificidade é maior para a espécie *Cp. pneumoniae*.

Os testes imunoenzimáticos para clamídias e clamidófilas têm sido questionados pelas suas baixas especificidades e sensibilidades, com a ocorrência de reações cruzadas com vários outros microrganismos, sendo utilizados como testes de triagem.

### Immunoblot

Teste de triagem qualitativo para a pesquisa de *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae* e *Cp. psittaci* que emprega antígenos fixados em fitas de nitrocelulose e utiliza a reação imunoenzimática heterogênea para a pesquisa de anticorpos IgG, IgA e IgM específicos. A diferença para o enzimaimunoensaio convencional é que utiliza substratos que, após a ação da enzima conjugada ao anticorpo de revelação, alteram a cor e precipitam na fita de nitrocelulose, o que torna possível sensibilidade de 80% e especificidade de 82%. Pode ser utilizado como teste de triagem ou confirmatório para outras reações imunológicas, como imunofluorescência indireta, microimunofluorescência e enzimaimunoensaio.

## ■ Técnicas de aplicação de ácidos nucleicos

Em virtude de sua alta sensibilidade e especificidade, as técnicas de aplicação de ácidos nucleicos (TAAN) são as mais indicadas para pesquisa dos microrganismos dos gêneros *Chlamydia* e *Chlamydophila* na rotina laboratorial. Essas técnicas têm sido utilizadas para detectar a bactéria em vários materiais biológicos, como urina, secreções e swabs com raspados cervicais, endocervicais, uretrais e oculares. Esses procedimentos e a variedade de materiais facilitam o estabelecimento de programa de triagem em indivíduos assintomáticos, bem como pode ser utilizado como confirmatório de resultados obtidos por testes diretos ou indiretos. Na maior parte das avaliações, os TAAN apresentam uma positividade 20 a 30% mais elevada do que a encontrada pelos outros testes diretos.

Essas técnicas detectam pequenas quantidades de ácidos nucleicos em materiais biológicos diversos a partir da amplificação do DNA ou RNA ribossômico (rRNA) 16S do microrganismo na amostra biológica. São geradas milhares de cópias de um segmento de DNA, a partir de iniciadores (*primers*) constituídos de oligonucleotídeos complementares a uma sequência de DNA-alvo. Os iniciadores definem a região de DNA do microrganismo a ser amplificada e também a sua especificidade.

Os principais testes comerciais de amplificação aprovados por instituições internacionais têm na reação em cadeia de polimerase (PCR), na reação em cadeia da ligase (LCR) e no ensaio de amplificação mediado por transcrição (TMA) os seus principais representantes. A PCR e a LCR amplificam uma sequência de nucleotídeos do DNA plasmidial que está presente em múltiplas cópias em cada CE das clamídias, e o método de TMA amplifica um fragmento de rRNA clamidial, que também está presente em múltiplas cópias. Essas técnicas não necessitam de CE íntegros, pois existe multiplicidade dos sítios ativos de amplificação, e menos de um CE presente na amostra é capaz de produzir resultado positivo. Esses métodos podem apresentar resultados inconclusivos se houver problemas na coleta do material, contaminações e até inibição das reações de amplificação.

A técnica de PCR depende do DNA plasmidial, e é considerada a mais sensível em razão da possibilidade de detectar um alvo com 7 a 10 cópias de DNA, enquanto aquele que amplifica o gene do MOMP tem como alvo apenas uma cópia de DNA. A especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR dependem dos iniciadores (*primers*) utilizados, do tipo de material, da preparação da amostra, da técnica de referência e do método de detecção do produto amplificado, levando-se sempre em consideração que existem muitos inibidores que interferem na reação. O recurso para detectar esses inibidores na amostra exige a introdução de reação de controle de amplificação que envolve diluição da amostra e repetição dos testes e uma reação em duplicata, contaminando propositalmente uma das amostras.

Amostras de raspado do canal endocervical, raspado uretral e urina têm sido utilizadas para a detecção de *C. trachomatis* por PCR. Para a coleta da amostra endocervical, o excesso de muco deve ser removido com um swab. Posteriormente, deve-se introduzir o swab de coleta no interior do canal endocervical, girar o swab por 3 a 5 segundos e retirar, evitando que o swab encoste na parede vaginal. Deve-se colocar o swab no respectivo tubo identificado, armazenar sob refrigeração, por até 5 dias.

Para a coleta de urina, deve-se coletar 10 a 50 mL do material biológico do primeiro jato, após a retenção do mesmo nas



2 h anteriores à coleta. As amostras devem ser transportadas em tubo estéril, sem conservantes, e podem ser encaminhadas ao laboratório à temperatura ambiente e, posteriormente, armazenadas a 2 a 4°C até 4 dias após a coleta.

Uma vantagem dos métodos de diagnóstico molecular é a possibilidade de se utilizarem amostras de urina, que é uma alternativa mais aceitável para pacientes do sexo masculino e para as mulheres que não requerem um exame clínico pélvico. Em geral, os métodos de diagnóstico molecular realizados com amostras endocervicais apresentam maior sensibilidade do que em urina em mulheres; entretanto, em homens assintomáticos, estes métodos são mais sensíveis quando são realizados com amostras de urina do que com *swabs* uretrais. O uso de amostras de urina para o diagnóstico da infecção em homens poderá aumentar a aceitabilidade do teste, principalmente pelos indivíduos assintomáticos, que são relutantes para a realização da coleta de *swab* uretral.

Um novo alvo para o diagnóstico molecular por meio de PCR pode discriminar entre os sorovares ocular (A-C) e genital (D-K) da *C. trachomatis*. O sequenciamento genômico das cepas ocular e urogenital da *C. trachomatis* descobriu uma diferença entre esses dois sorovares, constituída especificamente de uma deleção de 125 pares de bases no genoma da cepa A/AAR-13. A perda do fragmento de 125 pares de bases é exclusiva da cepa ocular, confirmando a associação do oculotropismo com esta deleção. Esta deleção, denominada CTA0934, pode ser um marcador útil na diferenciação entre os sorovares oculotrópico e genitotrópico da *C. trachomatis*.

Outra vantagem do emprego da técnica PCR é a possibilidade de genotipagem que pode ser feita por sequenciamento de nucleotídeos direto na amostra, submetida a reações de amplificação do gene *omp1*, diferente da sorotipagem, que é realizada a partir de cultura seguida de aplicação de painel de anticorpos monoclonais. Após a amplificação por PCR do gene *omp1* que codifica as MOMP encontradas nos isolados cervical ou uretral, a diversidade genética pode ser determinada por dois métodos: pelo polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), que consiste na digestão do produto amplificado com enzimas de restrição, ou pelo sequenciamento de nucleotídeos obtidos no fragmento do gene *omp1*, amplificado pela PCR. O RFLP é um procedimento mais sensível e menos laborioso em relação à técnica de sorotipagem convencional.

A sensibilidade de detecção da *C. trachomatis* pode ser aumentada com o uso da *nested* PCR, que compreende duas etapas consecutivas de amplificação. A segunda etapa é realizada com um segundo conjunto de *primers* internos que têm como alvo uma região do fragmento amplificado na primeira etapa da reação. Seu uso é indicado para amostras muito pequenas de DNA. Entretanto, aumenta o risco de um resultado falso-positivo devido à facilidade de contaminação com produtos amplificados em reações anteriores.

A amplificação e a detecção do DNA da *C. trachomatis* em amostras humanas também podem ser realizadas pela PCR em tempo real, um método que vem ganhando espaço nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico clínico por possibilitar o monitoramento da reação de PCR enquanto os ciclos são repetidos, com possibilidade de se detectar o produto da amplificação à medida que ele está sendo formado. Entretanto, o seu custo é mais elevado.

Outro método utilizado com índice menor de contaminação é a técnica de amplificação baseada no sequenciamento de ácidos nucleicos (NASBA), isotérmico, que detecta rRNA 16S da *C. trachomatis*.

No TMA, as moléculas de rRNA clamidial-alvo de amplificação são liberadas no meio de transporte, isoladas por captura e separadas por partículas magnéticas. Os produtos de amplificação do rRNA são detectados por hibridização com sondas de DNA de fita simples quimioluminescentes. O teste pode ser realizado em 8 h e apresenta pouco risco de contaminação.

As principais diferenças entre os métodos disponíveis comercialmente encontram-se no esquema de amplificação, no tipo e na quantidade de enzimas utilizadas na reação e se há necessidade de ciclos térmicos na sua realização.

Um vasto número de protocolos com base na amplificação do ácido nucleico, bem como a utilização de diferentes alvos para amplificação (fragmento *PstI*, os genes *ompA*, *omcB*, *Pmp4* e o rRNA 16S) e métodos de detecção têm sido utilizados para a pesquisa direta de *Cp. pneumoniae*. No entanto, a técnica PCR nas suas diversas versões, em razão da falta de uma melhor padronização e validação, tem gerado resultados controversos e inconclusivos. A grande variabilidade dos resultados descritos na literatura deve-se, também, ao uso de diferentes amostras biológicas para a detecção da *C. pneumoniae*, tais como escarro, *swab* ou lavado nasofaríngeo ou orofaríngeo, lavado broncoalveolar ou líquido pleural. O uso de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em seguida à digestão com proteinase K no procedimento de extração de DNA de lavado broncoalveolar reduz significativamente a presença de inibidores da amplificação por PCR e a incidência de resultados falso-negativos para a detecção de *Cp. pneumoniae* e *Cp. psittaci*.

Em relação à *Cp. psittaci*, a identificação é possível com a amplificação por PCR do gene *ompA* e posterior análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), quando diferentes genótipos são definidos pelos padrões de clivagem das enzimas de restrição, uma vez que os anticorpos monoclonais utilizados para diferenciar os sorovares aviários não estão disponíveis comercialmente. Os genótipos *ompA* atualmente aceitos (A-F, E/B, M56 e WC) são concordantes com os sorovares e podem ser identificados pela PCR em tempo real específica para cada genótipo. Inibidores da PCR presentes nas fezes de animais podem ser eliminados com um sistema comercial de purificação de DNA, no qual o DNA a ser isolado se liga a partículas de vidro na presença de iodeto de sódio e, subsequentemente, é lavado e eluído. Devido ao baixo índice de prevalência das doenças em nosso meio, este ensaio tem sido pouco utilizado em espécimes clínicos.

Avaliando o benefício da técnica de aplicação de ácidos nucleicos, o aumento da sensibilidade e a possibilidade de utilização de vários materiais biológicos têm tornado esses métodos os de referência, principalmente para o diagnóstico laboratorial de *C. trachomatis*. Em contrapartida, é importante salientar que o custo e os problemas relacionados com contaminação e inibição, que podem levar a 5% das amostras positivas em culturas, e o fato de outros testes serem negativos nestas técnicas representam desvantagens que devem ser levadas em conta.

### Hibridização de ácidos nucleicos

Dois testes de hibridização de ácidos nucleicos (HAN) estão disponíveis comercialmente, utilizados para o diagnóstico de *C. trachomatis*. O primeiro utiliza sonda de DNA, complementar ao rRNA 16S do genoma das clamídias, marcado com éster de acridina. Ao hibridizar-se com o DNA-alvo, a sonda é adsorvida por magnetismo e a reação é quantificada com o uso de luminômetro. A sensibilidade varia de 70 a 95%, dependendo do grupo



de pacientes testados, do tipo de amostra e da versão do teste utilizado. A especificidade alcança 97%. O outro teste emprega o sistema de captura híbrida desenvolvido em microplaca. O DNA-alvo, encontrado no material biológico, é desnaturado e hibridizado com sonda de RNA. Os híbridos DNA/RNA são capturados sobre a superfície de microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos DNA/RNA. Os híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos e são detectados por substratos quimioluminescentes. A segunda geração de testes que empregam o sistema de captura híbrida utiliza o processo de amplificação de sinal de leitura quimioluminescente e apresenta sensibilidade de 95% e especificidade de 99%, mais elevadas que os testes de primeira geração, detecção de antígenos por imunofluorescência direta ou cultura.

Estes testes têm sido recomendados para pesquisa do microrganismo em raspados endocervicais e uretrais, utilizando *swabs* específicos, mas não são indicados quando o material são secreções vulvovaginais ou urina.

## ► Interpretação e repercussão dos resultados

O diagnóstico laboratorial das clamídias e clamidófilas é um desafio, mas, com o advento dos métodos moleculares, a pesquisa dos microrganismos se tornou mais eficaz, tornando possível a detecção dos gêneros e espécies infectantes em uma gama variada de materiais biológicos.

Resultados positivos em pesquisa direta, tanto por amplificação de ácidos nucleicos como por imunofluorescência direta podem indicar a infecção, bem como servir para o acompanhamento do tratamento. É importante salientar que, até 3 semanas após completada a terapia em indivíduo infectado, podem-se encontrar antígenos, o que é indicativo da persistência dos mesmos e até sua resistência ao tratamento proposto. Portanto, os métodos imunológicos, como pesquisa de anticorpos IgG, IgA e IgM, também hoje são utilizados para triagem e avaliação de tratamento. Nos casos de *C. trachomatis*, apenas os anticorpos IgG e IgA, com análises pareadas, são aconselháveis para a avaliação da terapia e a sua resultante. Nos casos de *Cp. pneumoniae*, quando a presença do patógeno é investigada, apenas a pesquisa de anticorpos IgM é indicada concomitante aos testes de cultura e moleculares.

Quando um teste molecular é empregado para a detecção de *C. trachomatis* na ausência de sintomas clínicos, com o objetivo de triagem populacional, um resultado positivo deve ser avaliado com cautela. A realização de testes de triagem com elevada sensibilidade em populações de baixa prevalência da doença pode resultar em grande número de resultados falso-positivos, em razão do baixo valor preditivo positivo do teste, dependendo da exata especificidade do teste. Um resultado falso-positivo para a infecção por *C. trachomatis*, por sua vez, pode acarretar profundas implicações psicológicas, o que pode justificar a realização de um teste confirmatório da infecção clamidial em indivíduos de um grupo de baixo risco para esta infecção.

## ► Bibliografia

Agrawal T, Vats V, Wallace PK *et al.* Role of cervical dendritic cell subsets, costimulatory molecules, cytokine secretion profile and betaestradiol in development of sequelae to *Chlamydia trachomatis* infection. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6:46.

- Azenabor AA, Kennedy P, Balistreri S. *Chlamydia trachomatis* infection of human trophoblast alters estrogen and progesterone biosynthesis: an insight into role of infection in pregnancy sequelae. *Intern J Med Sci* 2007; 4(4):223-231.
- Beeckamn DSA, Vanrompay DCG. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(1):11-17.
- Bennedsen M, Berthelsen L, Lind I. Performance of three microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M, G and A antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:833-839.
- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:160-184.
- Brade H, Brade L, Nano FE. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2508-2512.
- Carlson JH, Porcella SF, McClarty G, Caldwell HD. Comparative genomic analysis of *Chlamydia trachomatis* oculotropic and genitotropic strains. *Infect Immun* 2005; 73(10):6407-6418.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Morb Mort Wkly Rep* 2002; 51(RR-6):1-77.
- Cevenini R, Donati M, Sambri V. *Chlamydia trachomatis* – the agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16 (6):761-773.
- Chia JK, Chia LY. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection: a treatable cause of chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 1999; 29:452-453.
- Colmegna I, Cuchacovich R, Espinoza RL. HLA-B 27-associated reactive arthritis: pathogenics and clinical considerations. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:348-369.
- Combes BK, Mahony JB. cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2001; 69(3):1420-1427.
- Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L *et al.* Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med* 2005; 142: 914-925.
- Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp 1 genotyping. *J Infect Dis* 2000; 182:909-916.
- Derfuss T, Gürkov R, Berg FT *et al.* Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 2001; 124:1325-1335.
- Dowell SF, Peeling W, Boman J *et al.* Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assay: recommendations from the Central Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Center for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33:492-503.
- Essig A, Zucs P, Susa M *et al.* Diagnosis of ornithosis by cell culture and polymerase chain reaction in a patient with chronic pneumonia. *Clin Infect Dis* 1995; 21:1495-1497.
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales proposal of Parachlamydiaceae fam. Nov. and Simkaniaceae fam. Nov., each containing one monotypic genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49:415-440.
- Farencena A, Comanducci M, Donati M *et al.* Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect Immun* 1997; 65:2965-2969.
- Fredlund H, Falk L, Jurstrand M *et al.* Molecular genetic methods for diagnosis and characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. *APMIS* 2004; 112:771-784.
- Fukushi H, Hirai K. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. Nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:306-308.
- Geens T, Dewitte A, Boon N *et al.* Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet Res* 2005; 36(5-6):787-797.
- Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ *et al.* Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol* 2006; 188(1):275-286.
- Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC *et al.* A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990; 161:618-625.
- Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl. 3):S402-S410.
- Hermann C, Gueinzus K, Oehme A *et al.* Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G against *Chlamydophila pneumoniae* to a microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2476-2479.
- Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S *et al.* Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 2004; 72(4):1843-1855.



- Horn M, Collingro A, Schmitz-Esser S *et al.* Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 2004; 304:728-730.
- Jee J, Degraives FJ, Kim T *et al.* High prevalence of natural *Chlamydia* species infection in calves. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5664-5672.
- Johson RE, Newhall WJ, Papp JR *et al.* Screening test to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51:1-38.
- Justrand M, Falk L, Fredlund H *et al.* Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp 1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3915-3919.
- Kalman S, Mitchell W, Marathe R *et al.* Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *Nat Genet* 1999; 21:385-389.
- Kent CK, Chaw JK, Wong W *et al.* Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal *Chlamydia* and gonorrhea detected in two clinical setting among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. *Clin Infect Dis* 2005; 41:67-74.
- Ker JM, Maass V, Maass M. *Chlamydia pneumoniae*-induced pathological signaling in the vasculature. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 55:131-139.
- Krüll M, Bockstaller P, Wuppewmann FN *et al.* Mechanisms of *Chlamydia pneumoniae*-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:375-382.
- Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2007; 44:568-576.
- Kuo C, Campbell LA. *Chlamydia pneumoniae* pathogenesis. *J Med Microbiol* 2002; 51:623-625.
- Loens K, Beck T, Ursi D *et al.* Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *J Microbiol Methods* 2008; 73:257-262.
- Loens K, Beck T, Ursi D *et al.* Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):185-191.
- Mabey D, Peeling RW. *Lymphogranuloma venereum*. *Sex Transm Infect* 2002; 78:90-92.
- Madico G, Quinn T, Boman J *et al.* Touchdown enzyme time release – PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* using 1S and 16S-23S spacer rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1985-1993.
- Mahony JB, Coombes BK, Chernesky MA. *Chlamydia* and *Chlamydia*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*, 8 ed., Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003: 991-1004.
- McClarty G, Caldwell HD, Nelson DE. Chlamydial interferon gamma immune evasion influences infection tropism. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10:47-51.
- Messmer TO, Martinez J, Hassouna F *et al.* Comparison of two commercial microimmunofluorescence kits and an enzyme immunoassay kit for detection of serum immunoglobulin G antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:588-592.
- Miettinen A, Heinonen PK, Teisala K *et al.* Antigen specific serum antibody response to *Chlamydia trachomatis* in patients with acute pelvic inflammatory disease. *J Clin Pathol* 1990; 43:758-761.
- Montalban GS, Roblin PM, Hammerschlag MR. Performance of three commercially available monoclonal reagents for confirmation of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1406-1407.
- Morre SA, Munk C, Persson K *et al.* Comparison of three commercially available peptide-based immuno-globulin IgG and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *J Clin Microbiol* 2002; 40:584-587.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia médica*, 5 ed., São Paulo: Elsevier, 2006: 455-463.
- Nelson DE, Virok DP, Wood H *et al.* Chlamydial IFN- $\gamma$  immune evasions is linked to host infection tropism. *PNAS* 2005; 102(30):10658-10663.
- Nelson HD, Helfand M. Screening for chlamydial infection. *Am J Prev Med* 2001; 20:95-107.
- Newhall WJ, Johnson RE, De Lisle S *et al.* Head-to-head evaluation of five *Chlamydia* tests relative to a quality-assured culture standard. *J Clin Microbiol* 1999; 7:681-685.
- Ossewaarde JM. New methods in diagnostic and epidemiological research of *Chlamydia trachomatis* infection: the tide is turning molecular. *J Europ Acad Dermatol Venereol* 1995; 5:111-123.
- Peeling RW, Wang SP, Grayston JT *et al.* *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variations in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 2000; 181:426-429.
- Peeling RW, Mabey D, Herring A *et al.* Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? *Nature Reviews* 2003; 4: 909-921.
- Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 2006; 349:2424-2430.
- Perry LL, Su H, Feilzer K *et al.* Differential sensitivity of distinct *Chlamydia trachomatis* isolates to IFN- $\gamma$ -mediated inhibition. *J Immunol* 1999; 162:3541-3548.
- Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practically and costs. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2):312-318.
- Pickett MA, Everson JS, Pead PJ *et al.* The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*: accurate determination of copy number and paradoxical effect of plasmid-curing agent. *Microbiology* 2005; 151:893-903.
- Poppert S, Essig A, Marre R *et al.* Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:4081-4089.
- Pospischil A, Thoma R, Hübl M *et al.* Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly* 2002; 132:1281-1289.
- Rampf J, Essig A, Hinrichs R *et al.* Lymphogranuloma venereum – a rare cause of genital ulcers in central Europe. *Dermatology* 2004; 209:230-232.
- Read TG, Myers GS, Brunham RC *et al.* Genome sequence of *Chlamydia caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:2134-2147.
- Richardson E, Sellors JW, Mackinnon S *et al.* Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infections and specimen collection preference among women using self-collected vaginal swabs in community setting. *Sex Transm Dis* 2003; 30:880-885.
- Sachse K, Laroucau K, Hotzel H *et al.* Genotyping of *Chlamydia psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiol* 2008; 8:63.
- Schachter J, Hook EW, Martin DH *et al.* Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATS) for *Chlamydia trachomatis*: all NAATS are not created equal. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1372-1373.
- Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA *et al.* Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3784-3789.
- Schachter J, Stephens RS, Timms P *et al.* Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:249-253.
- Sheehy N, Markey B, Gleeson M *et al.* Differentiation of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* strains by species-specific PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12):3175-3179.
- Shimada K, Chen S, Dempsey PW *et al.* The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydia pneumoniae* lung infection. *PLOS Pathogens* 2009; 5(4): e1000379.doi:10.1371.
- Solomon AW, Peeling RW, Foster A *et al.* Diagnosis and assessment of trachoma. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:982-1011.
- Sriram S, Straton CW, Yao S *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection of the nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 46:6-14.
- Tondella ML, Talkington DF, Holloway BP *et al.* Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:575-583.
- Tong CYW, Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *J Clin Pathol* 1993; 46:313-317.
- Trabulsi LR, Martinez MB. *Chlamydia*. In: *Microbiologia*, 4 ed., São Paulo: Atheneu, 2005: 441-443.
- Van der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L *et al.* Multicenter evaluation of BD Probe Tec ET system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1008-1016.
- Van der Pol B, Willian JA, Smith NJ *et al.* Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the Rapid Capture System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3558-3564.
- Vats V, Agrawal T, Salhan S *et al.* Primary and secondary immune responses of mucosal and peripheral lymphocytes during *Chlamydia trachomatis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 48:280-287.
- Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-Van Casteren SCA *et al.* Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol* 1998; 36(8):2301-2307.
- Verminden K, Duquenne B, Keukeleire DD *et al.* Evaluation of a *Chlamydia psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):281-285.
- Walder G, Hotzel H, Brezinka C *et al.* An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognized infection with *Chlamydia abortus*. *Obstet Gynecol* 2005; 106:1215-1217.
- Wang S. The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: technique and interpretation. *J Infect Dis* 2000; 181:421-5.
- Zeidler H, Kuipers J, Kohler L. Chlamydia-induced arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:380-392.



## Capítulo 16

---

# Infecção por Micoplasmas

*Regina Ayr Florio da Cunha, Kioko Takei e  
Lilian Ferri Passadore*

- Introdução, 207
- Micoplasmas humanos de interesse clínico, 208
- Referências bibliográficas, 216



## ► Introdução

À luz de uma breve perspectiva histórica, serão abordadas algumas considerações gerais sobre os micoplasmas. Quando o assunto parecia remontar dados relevantes do passado, o mundo científico se surpreendeu com o anúncio do pesquisador e empresário J. Craig Venter sobre a criação da primeira linhagem de células viáveis de um ser vivo controlada por um genoma totalmente sintetizado em laboratório.

Pela primeira vez, a humanidade foi apresentada a uma criatura desprovida de ancestrais, que recebeu, dos químicos da Blue Heron que a produziram, a terminologia *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn 1.0. De acordo com Venter: “É a primeira espécie criada por um computador que se autorreplica.” Quem poderia imaginar que o protagonista do início da era da biologia sintética seria um micoplasma?<sup>1</sup>

Em 1962, Morowitz e Tourtellotte,<sup>2</sup> com o intuito de atrair a atenção para esses microrganismos, publicaram um artigo na *Scientific American*, enaltecendo o fato de serem os micoplasmas as menores células viventes, e organizaram, com o suporte da NASA, o primeiro encontro sobre a biologia molecular dos micoplasmas. O objetivo principal era o de construir uma célula viva com o mínimo de organelas exigido para reprodução e crescimento independentes, quais seriam: a membrana plasmática, os ribossomos e uma molécula de DNA circular, dupla hélice. Quase meio século depois, exposto ao mundo, *in foco* nas páginas do *Science*, surgiu o micoplasma, representante da célula mais simples de vida livre, podendo, então, ser criado artificialmente.

Do gênio Pasteur ao ousado pesquisador e empresário Venter, 130 anos se passaram; contudo, o mesmo entusiasmo de Pasteur pelos micoplasmas é, hoje, igualado ao de Venter, visto que, a partir do estudo e do conhecimento desses microrganismos, não se poderá mais afirmar que a ciência é a mesma.

A representatividade dos micoplasmas na etiologia das doenças remonta a 1880, quando Pasteur os associou a uma doença pulmonar grave, a pleuropneumonia, que afetava o gado bovino e dizimava rebanhos na Europa, Ásia e Austrália.

Aparecem amplamente distribuídos na natureza como parasitos e patógenos do homem, de animais, plantas e insetos.

As dificuldades para se obter o crescimento em meios artificiais, em geral empregados para cultivo de bactérias, e a observação de um pleomorfismo intenso à luz da microscopia óptica comum não deixaram dúvidas quanto ao caráter incomum dos micoplasmas.

Durante muitas décadas, apesar do imenso progresso no conhecimento de sua natureza, de sua relação com outros microrganismos e posição taxonômica, constituíram-se em grande enigma para os microbiologistas. O sucesso do cultivo desses microrganismos foi obtido em 1898, por Nocard e Roux, muito embora a sua classificação como formas L de bactérias, decorrente das semelhanças morfológicas celulares e coloniais (aparência de ovo frito), ainda sustentasse o equívoco durante algumas décadas.<sup>3</sup>

A controvérsia se encerrou no fim dos anos 1960, quando uma análise genômica ampla obtida por hibridação de DNA e a determinação das concentrações de guanina e citosina (C+G) atestaram, de maneira definitiva, que os micoplasmas eram incapazes de sintetizar precursores de parede celular em qualquer condição.

Em 1967, foram taxonomicamente inseridos na classe Mollicutes (do latim *Molli* = macia; *cutis* = pele), a qual, após análise da fração 16S do rRNA, passou a ser constituída por aproximadamente 200 espécies inseridas em 4 ordens, 5 famílias e 8 gêneros (*Acholeplasma*, *Anaeroplasm*, *Asteroleplasma*, *Spiroplasma*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma*) que se distinguem primariamente por diferenças morfológicas, necessidades nutricionais e tamanho do genoma. Dentre as quase 200 espécies, 17 são capazes de infectar o homem.<sup>4</sup>

Os micoplasmas não são somente os menores microrganismos que se autorreplicam, como também os que apresentam a mais simples ultraestrutura. A ausência de parede celular constitui-se em característica única entre os procariotos. O contato direto da membrana deste com a membrana da célula do hospedeiro dá origem à condição na qual, em princípio, poderia levar à fusão das duas membranas, tornando possível, além da transferência ou troca de antígenos, também a introdução do conteúdo citoplasmático do micoplasma no interior do citoplasma da célula hospedeira.<sup>5</sup>

Desse modo, as potentes nucleases dos micoplasmas, combinadas com radicais superóxido, podem ser responsáveis por efeitos clastogênicos e aberrações cromossômicas observadas em células eucariotas infectadas por esses microrganismos.<sup>6</sup>

Tais observações corroboram a tese de que os micoplasmas associados à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), como *M. penetrans* e *M. fermentans*, exibem potencial oncogênico, demonstrado pelas transformações celulares malignas observadas em cultura de células de embrião de camundongo infectadas por essas espécies.<sup>7</sup>

Embora existam diferenças no tamanho do genoma, todos os membros da classe Mollicutes apresentam genomas diminutos constituídos por 580 a 2.200 kb e baixas concentrações de C+G, as quais variam de 23 a 40 mol%. A compactação genômica significativa, que ocorreu durante a evolução micoplásmica de seu antecessor bacteriano, tornou-se possível pela adoção de seu modo de vida parasitário.

Em termos de características genotípicas, uma que se destaca é o códon de terminação (*stop codon*). Enquanto na maioria dos procariotos o códon UGA significa a interrupção da síntese proteica, para a maioria dos micoplasmas codifica o triptofano, sendo o *stop codon* destes representado por UAA e UAG.<sup>8</sup>

Algumas espécies patogênicas reorganizam seu DNA por meio de replicação de sequências gênicas dos *transpósons*, promovendo assim diversidade genética e maximizando o potencial de codificação de diferentes proteínas. Com o sequenciamento do RNA do grupo, foram classificados como oriundos de células *clostridial-like* gram-positivas, por deleção ou degradação do gene.<sup>9</sup>

A maioria dos micoplasmas que colonizam ou causam doença apresenta como características a aderência e a capacidade de “driblar” o sistema imune do hospedeiro, tendo sido referidos como “parasitos ideais”, pois levam a infecções brandas e crônicas, dificilmente causando a morte do hospedeiro.<sup>10</sup>

A adesão dos micoplasmas aos receptores da célula hospedeira é pré-requisito para colonização e infecção.

Estudos têm demonstrado que a perda da capacidade de adesão por mutação resulta em perda de infectividade, e, em casos de reversão da capacidade de citoaderência, observa-se um novo ganho de infectividade e virulência. Isso explica por que, dentro de um genoma diminuto, grande parte dos genes esteja envolvida com aderência.



Pesquisas desenvolvidas sobre doenças infecciosas têm dado um enfoque especial à variação antigênica das proteínas de superfície. Durante sua evolução e adaptação ao seu modo de vida parasitário, os micoplasmas desenvolveram vários sistemas genéticos que propiciaram uma gama variável de proteínas de superfície.

Infelizmente, sabe-se menos sobre a natureza molecular dos receptores para micoplasmas nas células do hospedeiro do que sobre suas adesinas.

## ► Micoplasmas humanos de interesse clínico

As espécies infecciosas humanas parecem ter predileção por mucosas, sendo encontradas na boca, no trato respiratório e no trato urinário. Assim, compondo o quadro das infecções humanas, podemos citar *Mycoplasma pneumoniae* como patógeno indiscutível do trato respiratório, e as espécies *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, com papel importante nas infecções do trato geniturinário.<sup>11,12</sup>

### ■ *Mycoplasma pneumoniae*

*Mycoplasma pneumoniae* é, dentre as espécies humanas, a mais bem estudada. Isolada pela primeira vez em 1944, em cultura de células de amostra de escarro proveniente de paciente com uma doença pulmonar incomum, foi, depois de algum tempo, definida como agente etiológico da pneumonia atípica primária (PAP).<sup>13,14</sup>

A forma atípica pneumônica se referia a uma pneumonia com sintomas respiratórios brandos e com desproporcional infiltração pulmonar, observada por meio de radiografias. A falência no tratamento com os antimicrobianos utilizados na época, penicilinas e sulfonamidas, contrastava com o que se observava nos casos de pneumonia; daí o termo atípica e primária, pois se acreditava ser esta a primeira doença pulmonar com etiologia incerta.

As infecções causadas por *M. pneumoniae* são, na maioria dos casos, autolimitadas, podendo eventualmente apresentar sinais clínicos mais graves, combinados com uma fase de convalescença prolongada.

Aproximadamente 25% das pessoas infectadas por *M. pneumoniae* podem apresentar complicações extrapulmonares, sendo as manifestações do sistema nervoso central as mais comuns. Tem sido ainda relatada a presença do microrganismo no líquido sinovial, no pericárdio e na corrente circulatória, entre outras.<sup>15</sup>

A análise genômica de *M. pneumoniae* possibilitou a identificação e a caracterização molecular das principais proteínas constitutivas do citoesqueleto. Algumas dessas proteínas podem se apresentar como adesinas, expostas na superfície, enquanto outras podem estar envolvidas na modulação da expressão destas na membrana do micoplasma.

A interação entre *M. pneumoniae* e as células do hospedeiro é mediada por uma organela de adesão polar, representada por uma proteína de 170 kDa designada P1 e por uma série de outras proteínas, HMW1, HMW2, HMW3 e P90, P40 e P30 com funções diversas.<sup>4</sup>

As proteínas HMW1, 2 e 3 estão envolvidas na formação e estabilização da organela de fixação, incluindo a localização de outras proteínas de adesão. Estabelecida esta estrutura polar, um conjunto complexo independente, constituído das proteínas B, C, juntamente com P1, completam a formação da organela de fixação funcional. *M. pneumoniae* e seus componentes subcelulares interagem com diversos tipos de receptores na célula hospedeira, tais como sialoglicoconjugados, ácido siálico livre de glicoproteínas e glicolípídios sulfatados.<sup>4</sup>

### Aspectos clínicos

Os sintomas podem variar, dependendo do grau de infecção. Em crianças menores que 5 anos, a infecção pode ser subclínica ou muito branda, autolimitada, restrita ao trato respiratório superior. Já em crianças em idade escolar e em adultos jovens a doença é mais grave, levando a pneumonia.

Os sintomas iniciais da infecção por *M. pneumoniae* podem seguir-se após um período de incubação de 2 a 3 semanas, podendo ser mais frequentemente caracterizados por tosse seca, febre, mal-estar, tremores, irritação da garganta e dores de cabeça. A evolução da doença pode resultar em pneumonia em 3 a 10% dos casos, e em 70% deles em traqueobronquite. Ocasionalmente, outros sintomas como faringite, otite e bronquite podem ocorrer. Infecções assintomáticas representam cerca de 20% dos casos.<sup>16,17</sup>

A maior parte dos sintomas respiratórios desaparece em 4 a 6 semanas, contudo podem ocorrer, mais raramente, complicações extrapulmonares envolvendo SNC (cerca de 7%), incluindo meningoencefalites, hemiplagia e psicose aguda, apresentando 10% de taxa de mortalidade. Nos casos não fatais, aproximadamente 1/3 dos pacientes permanecem com sequelas neurológicas. Podem ser observadas ainda lesões na pele, nas juntas e no pericárdio.<sup>18-20</sup>

### Epidemiologia

O microrganismo pode se difundir por meio de aerossóis respiratórios de indivíduos infectados. Embora *M. pneumoniae* seja, durante o ano todo, uma fonte contínua de infecções respiratórias, estas ocorrem predominantemente nos meses de inverno.

Cerca de 15% das pneumonias adquiridas em comunidade são causadas por *M. pneumoniae*, enquanto, em populações fechadas (campos de treinamento militar, internatos etc.), tais índices podem chegar a 50% dos casos. Em surtos familiares, as taxas de infecção infantil podem chegar a 81%.<sup>21</sup>

### Patogênese

Apesar de ser claro que a patogênese é um evento multifatorial com base não somente nos vários fatores de virulência do microrganismo, mas também no complexo papel da resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *M. pneumoniae*, pode-se destacar como sendo as principais propriedades do microrganismo no desenvolvimento da doença: a aderência às células epiteliais do trato respiratório regulada pela adesina de P1; a evasão à fagocitose; a motilidade e a secreção de substâncias, que, além de causarem dano celular, induzem a resposta imune.<sup>22</sup>

### Diagnóstico laboratorial

#### Cultura

São poucos os laboratórios clínicos que realizam o cultivo para pesquisa de *M. pneumoniae*, pelo fato de o microrganismo exigir meios de cultura nutricionalmente complexos e



ser de crescimento lento (8 a 12 dias), o que acaba propiciando o crescimento exuberante de outros microrganismos presentes na amostra clínica.

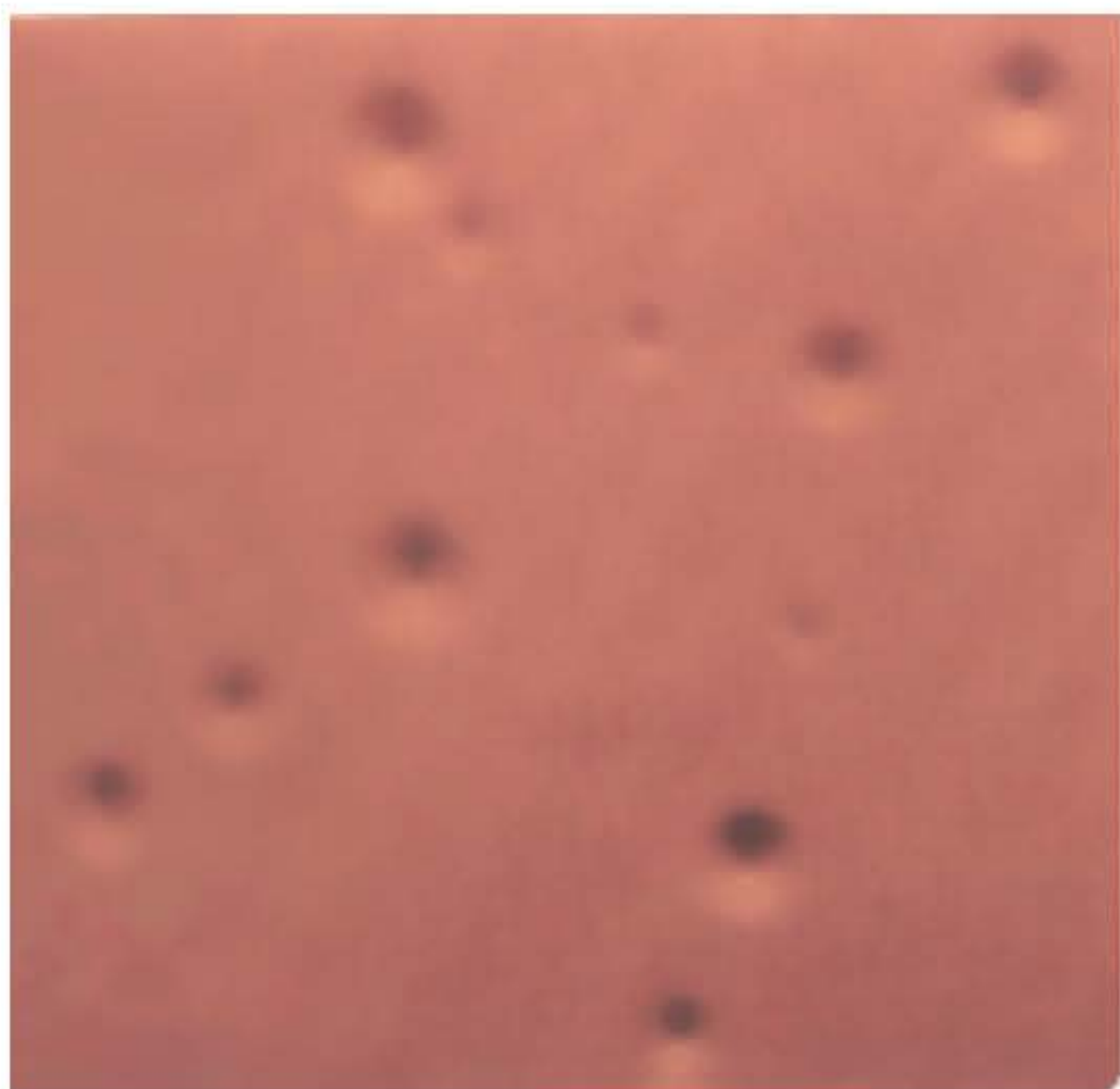
Dentre os meios utilizados, podem ser citados: meio seletivo difásico de glicose e azul de metileno, descrito por Kraybille em 1965, e o meio difásico SP-4, o qual possibilita o crescimento de *M. pneumoniae* de amostras clínicas mais rapidamente do que o meio difásico convencional.<sup>23</sup>

O crescimento é evidenciado pela observação da placa de semeadura, invertida, em microscópio óptico com objetivas de 10× ou 20×, de colônias com 10 a 100 µm de diâmetro, transparentes com uma zona central densa e uma área periférica translúcida, assemelhando-se a um “ovo frito”, característica esta da maioria dos Mollicutes (Figura 16.1).

A identificação final das colônias assim obtidas deve ser feita por meio do teste de inibição de crescimento ou de metabolismo, que consiste na habilidade do antissoro espécie-específico de impedir respectivamente o crescimento ou a produção de produto metabólico do micoplasma isolado, evidenciado pelo aparecimento de halo de inibição ao redor do disco contendo o antissoro ou pela mudança de cor do indicador do meio de cultura, respectivamente. Este procedimento é altamente espécie-específico, sendo o principal método para distinção das espécies.<sup>24</sup>

#### Detecção direta de *M. pneumoniae* do material clínico

Comercialmente, existem testes que possibilitam a detecção de *Mycoplasma pneumoniae* diretamente em amostras clínicas, Pneumofast® e Pneumofast® Ag (International Microbio, França). O primeiro baseia-se na cinética enzimática em meio líquido caracterizada pela acidificação do meio, verificada pela mudança de cor do mesmo decorrente do crescimento do micoplasma. O isolamento é obtido em ágar SP-4 a partir da semeadura do meio líquido. Dentre as amostras clínicas que podem ser analisadas podemos citar: escarro, lavado broncoalveolar; lavado sinusal; punção pleural; LCR e hemocultura. Pneumofast® Ag baseia-se em um teste rápido imunoenzimático, em que, por meio de filtração, os antígenos de superfície espécie-específicos são adsorvidos sobre a membrana filtrante e posteriormente identificados por um anticorpo policlonal anti-*M. pneumoniae* conjugado com peroxidase. O resultado positivo é revelado pelo aparecimento de cor vermelha em poucos minutos sobre a membrana. Os materiais clínicos que



**Figura 16.1** Colônias de *Mycoplasma pneumoniae* em meio sólido SP-4. Aumento de 100×.

podem ser utilizados são: lavado broncoalveolar, aspirado brônquico e swabs de garganta e nariz.

De um modo geral, os métodos de detecção de antígeno baseiam-se no cultivo e são lentos e trabalhosos; portanto, o diagnóstico das infecções por *M. pneumoniae* ainda se baseia principalmente nos métodos sorológicos, embora os métodos moleculares venham ganhando cada vez mais destaque no diagnóstico.

#### Crioaglutininas

O princípio do teste baseia-se na associação entre o aumento de crioaglutininas e a existência de infecção por *M. pneumoniae*. A infecção humana com *M. pneumoniae* representa uma doença em que carboidratos, presentes na superfície da célula hospedeira, são envolvidos na patogênese; primeiro, no estágio inicial da infecção e, posteriormente, na sequela causada por ela. *M. pneumoniae* adere às células do hospedeiro, via sialo-oligossacarídeo da poli-N-acetil-lactosamina, denominado antígeno I. Tais moléculas podem ser encontradas na superfície de hemácias e também em microvilosidades e cílios do epitélio respiratório.<sup>25</sup>

O que se observa na infecção por *M. pneumoniae* é uma alteração transitória do sistema autoimune, o qual é caracterizado por altos títulos de crioaglutininas. Tais anticorpos são dirigidos contra o antígeno I. O mecanismo responsável pela deflagração da resposta imune contra este antígeno não está bem definido, contudo algumas suposições incriminam a natureza celular do micoplasma, rica em lipídios, que complexada com o receptor, serviria como adjuvante para o antígeno I adjacente. Títulos de crioaglutininas são um dos primeiros parâmetros que se alteram durante a fase aguda da doença. Resultados negativos podem ocorrer em 50% dos pacientes, não excluindo, portanto, uma possível infecção por *M. pneumoniae*. Por outro lado, resultados positivos com títulos baixos (< 32) podem não significar doença causada pelo microrganismo, porque hemaglutininas são também encontradas não só em várias outras doenças respiratórias, como também na doença vascular do colágeno e no mieloma, entre outras.<sup>26</sup>

Apesar de este teste ser barato e muito simples, pela falta de especificidade, atualmente tem sido pouco explorado na rotina diagnóstica.

#### Pesquisa de anticorpos

Os testes que envolvem a determinação de anticorpos anti-*M. pneumoniae* utilizam extratos totais de *M. pneumoniae* (cepas padrão) ou antígenos de membrana do microrganismo como antígenos. Os anticorpos podem ser detectados pelos testes descritos a seguir.

► **Fixação de complemento (FC).** Ainda nos dias atuais, o teste de fixação de complemento (FC) é realizado frequentemente em comparação com outros testes, tais como ELISA IgM e ELISA IgG. Geralmente, há a necessidade de determinação em soros pareados obtidos na fase aguda da doença e na fase de remissão. Contudo, títulos de amostras isoladas de soro, superiores a 80, podem ser considerados como significantes. Testes que utilizam antígeno lipídico têm apresentado boa correlação com o da inibição metabólica.<sup>27</sup> Podem ser utilizados micrométodos, os quais empregam antígenos glicolipídicos de *M. pneumoniae*.<sup>28</sup>

► **Imunofluorescência indireta (IFI).** No teste de imunofluorescência indireta (ID) são utilizadas lâminas nas quais culturas de células ou de tecidos ou ainda cortes de pulmão infectados com micoplasma são fixados, sendo incubados com amostras de soro do paciente e, posteriormente, com o conjugado anti-



imunoglobulina humana. As vantagens do teste são as pequenas quantidades de antígeno necessárias e a possibilidade de detecção de qualquer classe de imunoglobulina. Títulos  $\geq 64$  são considerados significantes de resposta imune ao *M. pneumoniae*. A dificuldade de obtenção do antígeno tem, contudo, desencorajado seu uso.<sup>29</sup>

► **ELISA.** Os testes iniciais de ELISA utilizavam antígenos totais solubilizados, com a expectativa de que poderiam detectar anticorpos à maioria dos antígenos encontrados. Contudo, os anticorpos dirigidos contra as frações proteicas levaram à observação de muitas reações cruzadas.

Comercialmente, podem ser adquiridos os kits Platelia® IgM e Platelia® IgG (Sanofi Pasteur, França), os quais utilizam um sonificado de antígeno total constituído de grandes quantidades de proteínas de membrana de *M. pneumoniae*, imobilizado na fase sólida. O conjugado para ELISA IgM consiste em anticorpo monoclonal marcado com peroxidase. Títulos maiores do que 40 AU/ml (unidades arbitrárias/ml) são considerados significativos de infecção por *M. pneumoniae*. Títulos iguais ou inferiores a 40 AU/ml requerem realização do teste com nova amostra de soro, obtida 8 a 15 dias mais tarde, a fim de que sejam observados soroconversão ou aumento significativo do título.

Granström *et al.* têm ainda demonstrado por ELISA o papel de IgA no sorodiagnóstico precoce da infecção por *M. pneumoniae* quando comparado aos resultados obtidos por ELISA IgM captura. Ainda, em pacientes adultos, determinações combinadas de anticorpos das classes IgA e IgM possibilitam diagnóstico sorológico da doença durante a segunda ou a terceira semana. Considerando IgG a resposta mais regular, apesar de ser a última a surgir, deve ter função confirmatória, podendo permanecer positiva por períodos extensos, mesmo muito tempo após a infecção.<sup>30</sup>

O emprego do ELISA utilizando peptídios sintéticos como antígeno também tem sido descrito.<sup>31</sup> O reconhecimento de que a proteína P1 (165 a 170 kDa) é o imunógeno proteico principal da espécie e em razão de seu sequenciamento recente, muitos testes vêm sendo desenvolvidos utilizando frações proteicas purificadas dessa proteína. Antígenos de alto peso molecular foram utilizados em vários testes ELISA.<sup>32,33</sup>

Tais testes possibilitaram detectar variação dos níveis de anticorpos entre fase aguda e convalescente em pacientes com PAP. Embora tenha sido demonstrado que duas regiões do peptídio P1, entre leucina 801 e leucina 1139, contêm epítopos reativos, foi verificado que estas também apresentam alguma homologia com sequências conhecidas do antígeno de 140 kDa de *M. genitalium*, espécie que também pode ser encontrada no trato respiratório.<sup>34</sup>

De qualquer modo, reservas à parte, a utilização desses antígenos são perfeitamente possíveis no diagnóstico de infecção por *M. pneumoniae*.

► **Western blotting.** Este método tem se constituído em um dos mais importantes métodos de sorodiagnóstico, uma vez que não somente detecta anticorpos anti-*M. pneumoniae*, mas também possibilita a detecção, por meio do peso molecular, de cada antígeno envolvido. Vários estudos têm demonstrado que soro de pessoas com PAP na fase convalescente reconhece 5 peptídios de pesos moleculares, variando de 35 a 170 kDa. O perfil sorológico específico obtido confirma os resultados observados por ELISA e outros testes, propiciando também a seleção de peptídios candidatos a antígeno de maior reatividade para ELISA.<sup>35,36</sup>

Apesar de o *Western blotting* poder ser utilizado como teste confirmatório em casos em que são observados altos títulos

de anticorpos em pacientes sem pneumonia, o método não é utilizado na rotina diagnóstica pelas dificuldades de obtenção de kits comerciais.

► **Aglutinação com micropartículas | MAG assay (Serodia-Myco® II, Fujirebio, Japão).** Neste teste partículas artificiais de gelatina são sensibilizadas com componentes da membrana celular do *M. pneumoniae* e incubadas com diluições seriadas do soro do paciente. A leitura é visual e de acordo com o fabricante; títulos  $\geq 40$  são considerados significantes.

► **Aglutinação de látex (LA).** Partículas de látex são sensibilizadas com antígeno total de *M. pneumoniae* (*M. pneumoniae* Serofast®, International Microbio, DBV, França). O teste é realizado com soro do paciente diluído 1:10 e 1:40. O resultado é qualitativo, podendo ser expresso em cruzes. Títulos iguais ou superiores a 20 sugerem infecção corrente ou prévia. Títulos de 10 significam resultado negativo, porém, em pacientes com sintomas clínicos persistentes, o teste deve ser repetido após 7 a 14 dias. É de fácil execução, e sua leitura pode ocorrer em 3 min; é, por isso, recomendado como teste de triagem.

### Técnicas moleculares

► **Hibridação.** As primeiras técnicas com base em hibridação foram desenvolvidas em 1982 e tratava-se de sondas de DNA. Os sistemas utilizados diferiam no formato, na revelação (radioativa ou não radioativa) e, principalmente, no tipo de sonda. Genes da região 16S rRNA foram amplamente utilizados em sondas de DNA por várias razões, tais como: de um a três sets destes genes estão presentes nos micoplasmas, cuja sequência completa pode ser obtida para a maioria desses microrganismos, e incluem, além de regiões altamente conservadas, a existência de domínios variáveis, possibilitando a seleção de sondas específicas e não específicas.

Além do mais, vale lembrar que na célula há cerca de 10.000 cópias de moléculas de rRNA. Sondas que consistem em genes de rRNA têm sido propostas para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*. Kits comercializados pela Gene-Probe (San Diego, CA, EUA), que utilizam a metodologia, ainda não estão disponíveis em nosso mercado. Em decorrência da relativa falta de sensibilidade desta técnica ( $10^3$  a  $10^4$  CFU para kits de primeira geração), a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) substituiu-a com vantagens.<sup>37</sup>

► **PCR.** O primeiro registro sobre a aplicação de PCR no diagnóstico de infecções micoplásmicas referiu-se à detecção de *M. pneumoniae* e foi publicado em 1989.<sup>38</sup> Primers espécie-específicos têm sido escolhidos dentre vários genes que codificam as proteínas de interesse. No caso de *M. pneumoniae*, o gene que codifica a adesina P1 é o mais frequentemente utilizado.

► **PCR em tempo real (real time PCR).** As altas taxas de morbidade e ocasionalmente de mortalidade em pacientes com PAP (pneumonia atípica primária) têm reforçado a necessidade de rapidez no diagnóstico da infecção micoplásmica para que o tratamento possa ter início. Atualmente, o uso da PCR em tempo real incorpora a detecção de sinais enquanto ocorre a amplificação. Para isso, utilizam-se oligonucleotídeos e sondas específicas que emitem fluorescência a cada hibridação e a cada passo da amplificação. Por detectar regiões específicas, essa técnica possibilita uma rápida e precisa quantificação. Estudos recentes têm visado otimizar testes PCR em tempo real para detecção do microrganismo em amostras respiratórias.

Recentemente, têm sido otimizados ao menos 3 testes PCR em tempo real para detecção de *M. pneumoniae* em amostras respiratórias durante surtos da doença. Os estudos têm utilizado a detecção do gene da toxina CARDS (*community-acqui-*



*red respiratory distress syndrome*) e gene de ATPase, tendo sido selecionadas como alvos a toxina Mp 181 (CARDS) e duas ATPases (Mp3 e Mp7). Os testes demonstraram que a detecção de Mp181, gene da toxina CARDS, revelou ser de grande importância como marcador na detecção de DNA do *M. pneumoniae* em amostras respiratórias, podendo, é claro, ter seus níveis de confiança aumentados ao se introduzir simultaneamente a determinação de Mp3 e Mp7.<sup>39</sup>

O uso destes testes pode tornar possível a rápida identificação de *M. pneumoniae* em casos de surtos de PAP. Todavia, os mesmos ainda estão em fase de implementação e, portanto, não têm sido empregados na rotina diagnóstica laboratorial.

## ■ Micoplasmas colonizadores do trato urogenital

Dentre as várias espécies do gênero *Mycoplasma*, três delas – *M. hominis*, *M. genitalium* e *M. fermentans* – ocorrem no trato urogenital de adultos e têm sido associadas a várias doenças humanas.

As espécies do gênero *Ureaplasma*, *U. parvum* e *U. urealyticum* são, assim como *M. hominis*, de longe as mais isoladas do trato geniturinário, e a elas tem sido atribuída uma participação efetiva em uma variedade de condições clínicas, dentre as quais as que envolvem a gravidez, o recém-nascido e o feto.

Enquanto as espécies do gênero *Mycoplasma* não apresentam perfis bioquímicos significativamente diferentes uns dos outros, o que dificulta sua identificação bioquímica, o gênero *Ureaplasma*, por sua vez, apresenta a capacidade única de hidrolisar ureia para obter energia, o que o diferencia dos demais.

Os micoplasmas raramente se disseminam para outros órgãos, a menos que haja uma falha no sistema imune do paciente. Algumas espécies, como *M. genitalium*, contêm uma organela que facilita a citoaderência enquanto, no caso de *M. hominis* e *Ureaplasma* spp., a aderência ocorre por meio de proteínas, ainda não completamente caracterizadas.<sup>4</sup>

*M. hominis* apresenta um antígeno associado à aderência (Vaa) que exhibe variação de tamanho e de fase (variação na expressão de determinadas proteínas) e é altamente imunogênico. Presume-se que a alta variabilidade de Vaa seja importante para a adaptação do microrganismo a vários hospedeiros.

Similarmente à Vaa de *M. hominis*, o antígeno MB (banda múltipla), encontrado nas espécies do gênero *Ureaplasma*, também é imunogênico e apresenta alta taxa de variação de fase, podendo estar envolvido na estimulação da resposta inflamatória do hospedeiro, apresentando também variações de tamanho, sobretudo em isolados de processos invasivos. Cada sorotipo de *Ureaplasma* contém múltiplos genes MBA, e alguns sorotipos contêm múltiplas cópias do mesmo tipo de gene MBA. As variações nos antígenos MBA têm sido utilizadas como base para a separação das duas espécies do gênero.<sup>4</sup>

*M. fermentans* também não tem estrutura terminal de aderência, mas apresenta importantes proteínas de superfície de membrana, que medeiam a fusão celular, a citoaderência e a variação antigênica.<sup>40</sup>

Tanto *M. hominis* quanto as espécies do gênero *Ureaplasma*, *U. urealyticum* e *U. parvum*, podem induzir inflamação em humanos, principal fator envolvido na produção e manifestação de doença clínica.

Produtos de secreção, tais como amônia, gerada do metabolismo da arginina por *M. hominis* e da ureia por *Ureaplasma* spp., podem produzir um efeito citotóxico local. A produção de urease por ureaplasmas tem sido implicada na produção de cálculos urinários e, embora a produção de IgA proteases

e fosfolipases por ureaplasmas tenha sido descrita há muitos anos, o estudo dos genomas de vários sorotipos não revelou os genes responsáveis pela codificação dessas enzimas.<sup>41</sup>

A espécie *U. parvum*, contudo, apresenta em seu genoma genes para duas hemolisinas, justificando assim sua ação sobre hemácias e outras células do hospedeiro.<sup>9</sup>

► ***Mycoplasma hominis***. Foi o primeiro micoplasma humano descrito, tendo sido isolado, em 1937, de um abscesso de glândula de Bartholin por Dienes e Edsall. À época, o relato fazia uma correlação entre o microrganismo em questão e as espécies que vinham sendo isoladas de animais, sugerindo ser o isolado um caso típico de contaminação. Em 1940, o próprio Dienes, fazendo um estudo amplo da flora micoplásmica genital feminina, concluiu estar diante de uma espécie humana.<sup>42</sup>

*M. hominis* é um microrganismo oportunista e que reside, como comensal, no trato urogenital inferior, o que gera, algumas vezes, dúvidas sobre seu real papel patogênico. Contudo, a existência de dados probatórios confirma a participação da espécie na doença pélvica inflamatória, febres pós-parto e pós-aborto, tendo sido ainda associado a casos de vaginose bacteriana, entre outras. Em recém-nascidos pode causar pneumonia, meningite e abscessos, tendo sido também implicado em infecções extragenitais, especialmente em pacientes imunocomprometidos.<sup>41</sup>

Uma das possíveis razões dessa dubiedade quanto à real patogenicidade de *M. hominis* é a heterogeneidade da espécie.

Christiansen *et al.* (1987), utilizando sondas genéticas para detecção de *Mycoplasma* spp., notaram que a espécie *M. hominis* apresentava grande polimorfismo. Jensen *et al.* (1998), estudando cepas de *M. hominis* isoladas de diferentes pacientes, empregando SDS-PAGE e *pulsed-field electrophoresis*, concluíram que estas eram heterogêneas. Diante disso, os autores correlacionaram a heterogeneidade da espécie a uma capacidade personalizada de adaptação ao sistema imune do hospedeiro.<sup>43,44</sup>

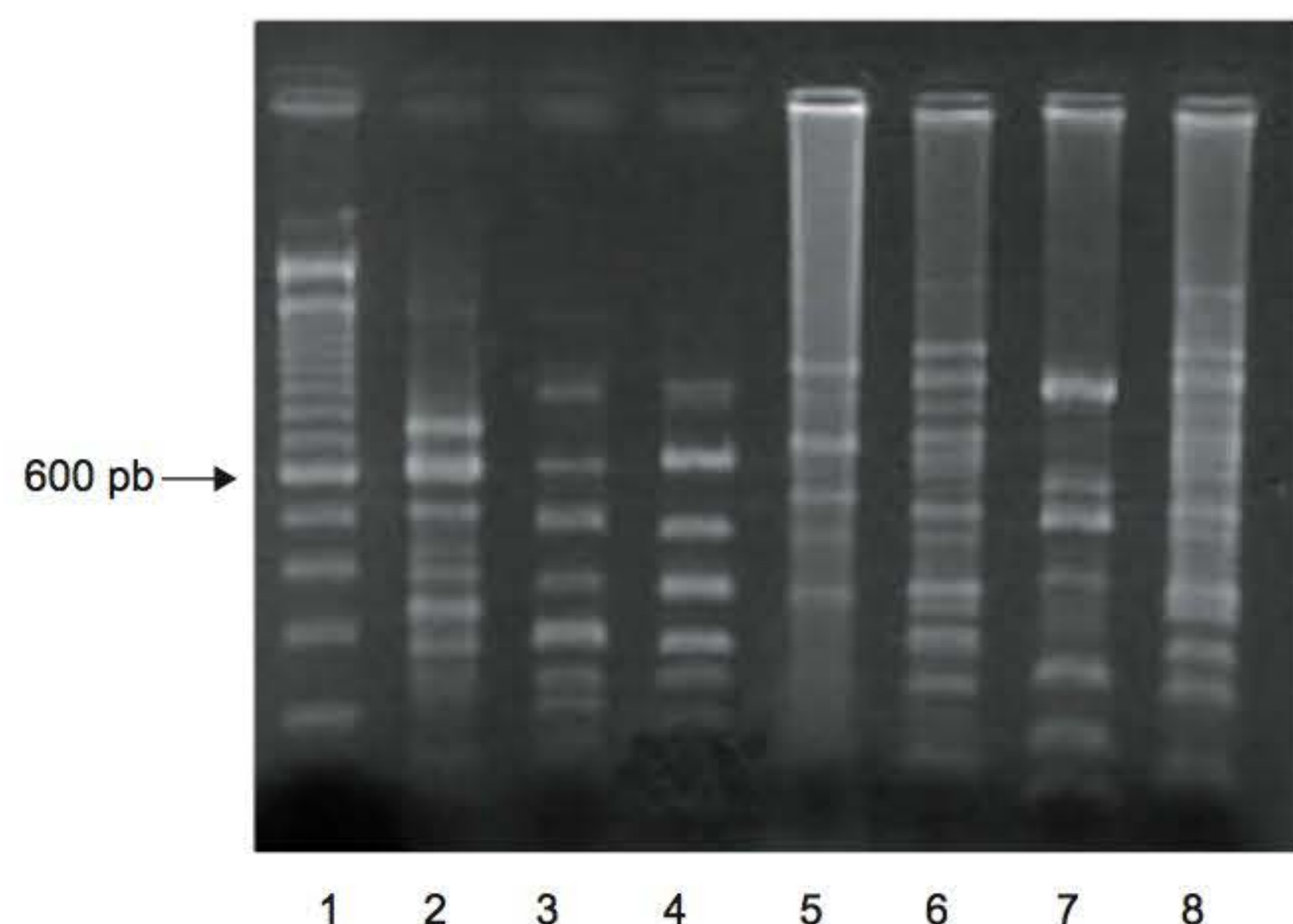
Vários são os métodos empregados na detecção da diversidade gênica de micoplasmas isolados de materiais clínicos: análise de restrição, eletroforese de campo reverso, *pulsed-field electrophoresis*, *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), hibridação DNA-DNA, entre outras. Estas análises, de modo geral, requerem um longo tempo de execução, muito material biológico, e seus resultados são, algumas vezes, difíceis de serem interpretados.<sup>45</sup>

Considerando a RAPD (amplificação randomizada de DNA polimórfico) uma metodologia promissora como marcador biológico e a discutida heterogeneidade da espécie *M. hominis*, foi introduzido, de maneira pioneira no Brasil, o referido método, para estudo das diferentes cepas isoladas de amostras clínicas. Os resultados revelaram vários perfis diferentes intraespécie, corroborando o conceito de existência de grande heterogeneidade intraespécie de *M. hominis*<sup>46</sup> (Figura 16.2 e Quadro 16.1).

Os resultados observados demonstram a existência de cinco perfis genômicos diferentes. As amostras 3 e 4 apresentaram perfis semelhantes entre si, e, da mesma maneira, as amostras 6 e 8 também foram semelhantes. As amostras 2, 5 e 7 apresentaram perfis peculiares e próprios, não similares a nenhum outro estudado.

A heterogeneidade da espécie se manifesta por substituições pontuais de nucleotídeos e aminoácidos e mutações no genoma, resultando em uma variação no tamanho do mesmo. Essa heterogeneidade intraespécie pode justificar a participação controversa de *M. hominis* em algumas doenças, sobretudo nos casos de vaginose bacteriana.





**Figura 16.2** Resultado da reação de RAPD nas cepas estudadas. 1, marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) DNA Ladder; 2-8, cepas de *Mycoplasma hominis*.<sup>46</sup>

**Quadro 16.1 • Relação das cepas de *M. hominis* analisadas e número de fragmentos observados após reação de RAPD.**

Cepa	Quantidade de fragmentos gerados após o RAPD
2	12 bandas
3	8 bandas
4	8 bandas
5	7 bandas
6	14 bandas
7	7 bandas
8	14 bandas

Apesar de todo arsenal molecular disponível para caracterização de microrganismos, dentre todas as espécies de micoplasmas com reconhecido papel patogênico para o homem, *M. hominis* (cepa PG21) é a única que teve seu genoma sequenciado na íntegra.<sup>47</sup>

► **Ureaplasma spp.** O gênero apresenta 14 sorotipos distintos e que foram agrupados, tomando-se como base a sequência 16S rRNA, em dois *clusters* ou biovariedades geneticamente relacionadas, e designadas, nos últimos anos, como espécies diferentes: *Ureaplasma parvum* (representada pelos sorotipos 1, 3, 6 e 14) e *Ureaplasma urealyticum*, que compreende os demais sorotipos (2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

Muitos esforços têm sido empreendidos com a finalidade de se determinar se uma ou outra espécie apresenta papel mais relevante nas doenças humanas. Kasper *et al.*, demonstraram que *U. parvum* foi isolado em concentrações mais elevadas no líquido amniótico de pacientes com histórico de corionionite, ruptura prematura de membranas, parto prematuro, seps e displasia brônquica. Houve ainda uma correlação muito forte entre a carga bacteriana de *Ureaplasma parvum* e a resposta inflamatória intensa caracterizada pela elevação dos níveis de IL-8.<sup>48</sup>

Já à espécie *Ureaplasma urealyticum* tem sido atribuído papel significativo nos casos de uretrites no homem.

### Epidemiologia

Tanto *Ureaplasma* spp. como *M. hominis* surgem como verdadeiros comensais pertencentes à flora dos tratos geniturinários masculino e feminino.

As altas taxas de colonização (40 a 70%) de *Ureaplasma* spp. no trato genital inferior de mulheres sexualmente ativas e assintomáticas têm dificultado o estabelecimento de relação entre sua presença e a real participação nas doenças.

Da mesma maneira, *M. hominis* tem sido detectado na vagina em aproximadamente 2/3 ou mais de mulheres com sintomas e em cerca de 10% de assintomáticas.<sup>49</sup>

A significância de tais achados baseia-se no número de microrganismos da cepa isolada. O número é traduzido por UFC/ml (unidades formadoras de colônias por ml) ou por CCU/ml (*color changed unit/ml*), sendo os critérios de avaliação utilizados para analisar a relação entre o número de microrganismos isolados e seu papel no quadro clínico, dependentes da amostra clínica estudada. Estes situam-se entre níveis mínimos de concentração, compreendidos entre  $10^3$  e  $10^4$  CCU/ml.

Alguns autores consideram como concentrações limítrofes para ambos os microrganismos em secreções vaginais, concentrações  $\geq 10^3$  CCU/ml, sendo  $\geq 10^4$  CCU/ml e  $\geq 10^3$  CCU/ml para casos de material endocervical e primeiro jato de urina, respectivamente. Para valores de *Ureaplasma* spp. em esperma devem ser considerados significantes concentrações  $\geq 10^3$  CCU/ml.<sup>50-53</sup>

### Patogênese

*Ureaplasma* spp. tem sido implicado em uma série de alterações gestacionais e infecções neonatais, e, em razão de sua alta prevalência em gestantes, têm sido estudadas as relações entre a colonização pela espécie e resultados da gestação, tais como: partos prematuros, abortos, ruptura prematura de membranas fetais, e nascidos com baixo peso. Dentre as várias hipóteses que tentam associar a infecção placentária e corionionite com aumento de risco de partos prematuros e de natimortos, está a síndrome de agressão da flora cervicovaginal. Embora não sejam bem conhecidos os mecanismos que associariam a infecção micoplásmica com prematuridade, sabe-se que algumas cepas de *Ureaplasma* spp. apresentam atividade de fosfolipases A e C endógenas, as quais poderiam atuar como fatores de estimulação uterina ao hidrolisar os fosfolipídios da placenta, produzindo ácido araquidônico livre, precursor de prostaglandinas.<sup>54</sup>

A Figura 16.3 demonstra como a infecção ureaplásmica intrauterina pode levar ao parto prematuro e a sequelas fetais (e também neonatais).

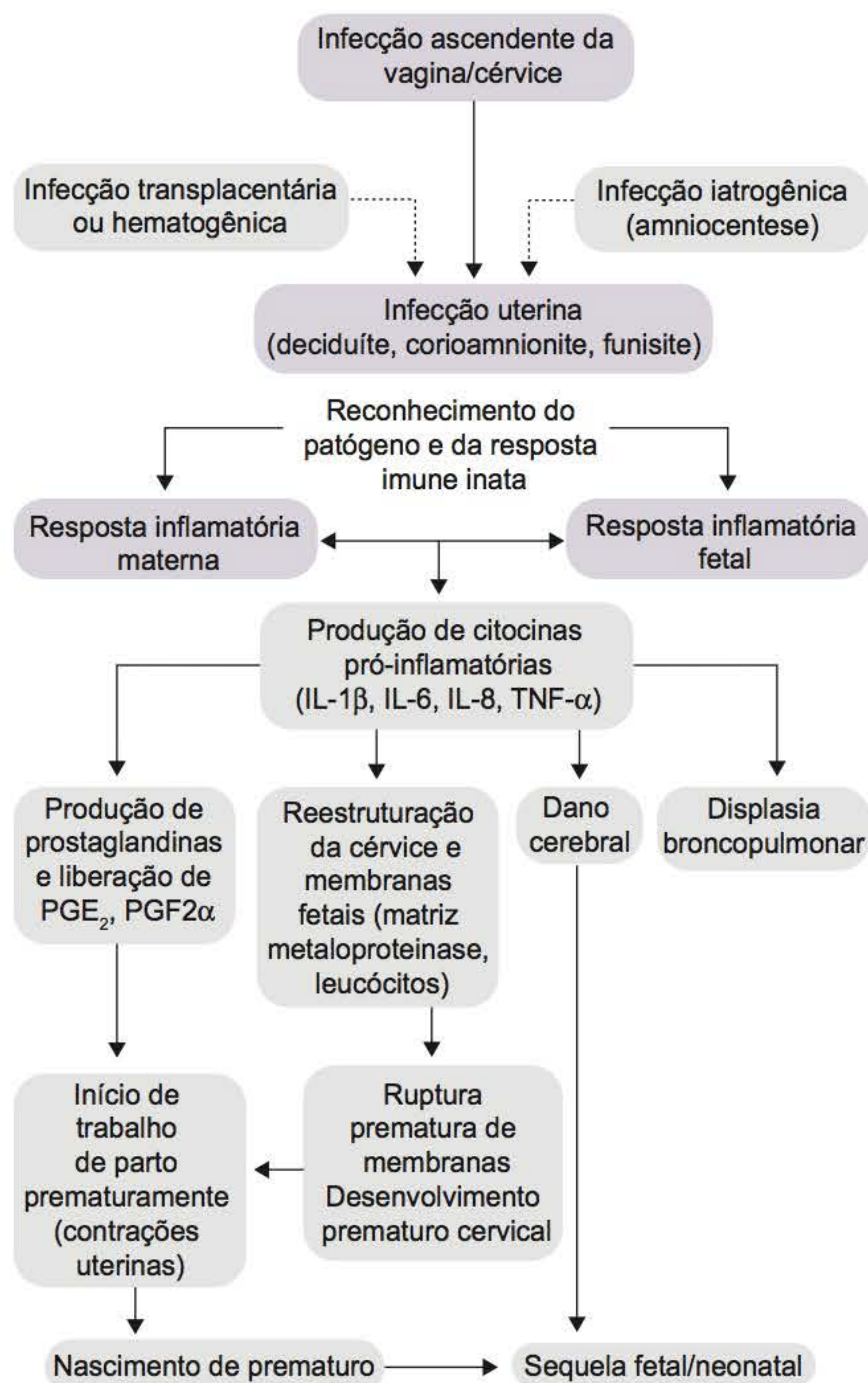
Constatou-se experimentalmente *in vitro* que, além de efeitos citopáticos sobre células, *Ureaplasma* spp. foi capaz de induzir alterações cromossômicas significativas, as quais variaram com a concentração do microrganismo inoculado e com o sorotipo testado.<sup>6</sup>

Apesar de não serem associados frequentemente a anomalias cromossômicas ou congênitas do feto, a alta frequência de perfis cromossômicos anormais, em tecidos fetais abortados e infectados pelas espécies tem sugerido a necessidade de mais estudos.<sup>55</sup>

Deve ser ainda considerado que cepas de *Ureaplasma* spp. podem produzir proteases específicas para IgA, sendo espécie-específicas. Desta maneira, a ação da IgA secretora em nível de mucosa seria bloqueada, facilitando a ação do micoplasma e de outras bactérias frequentemente associadas.

Vários estudos envolvem *Ureaplasma* spp., sobretudo a espécie *U. parvum* e a *M. hominis* na síndrome respiratória de recém-nascidos, principalmente aqueles nascidos com peso inferior a 1.000 g.<sup>9</sup>





**Figura 16.3** Prováveis mecanismos pelos quais *Ureaplasma* spp. pode invadir a cavidade intra-amniótica, produzir resposta inflamatória e iniciar o trabalho de parto prematuramente. Adaptada de Waites *et al.*, 2009.<sup>9</sup>

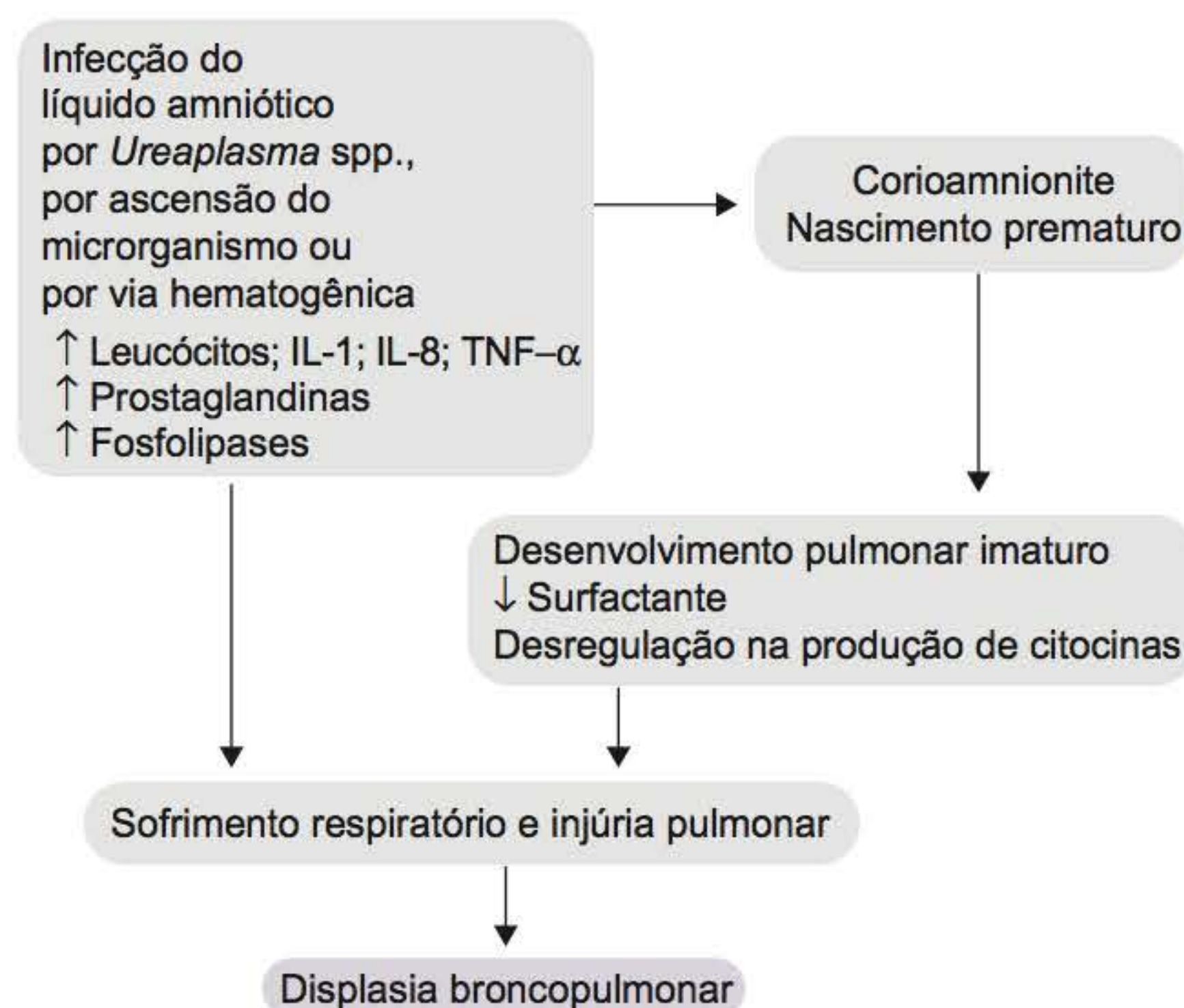
O isolamento de micoplasmas nas vias respiratórias aumenta a probabilidade de desenvolvimento de doença pulmonar crônica com quadro de pneumonia intersticial, podendo evoluir para hipertensão pulmonar persistente. Tais dados clínicos são sustentados pela detecção simultânea de anticorpos séricos contra *Ureaplasma* spp.

Diante de várias evidências clínicas, tem sido sugerido que muitas infecções respiratórias causadas por micoplasmas são adquiridas ainda no útero. A Figura 16.4 enfatiza algumas situações observadas nos casos de displasia broncopulmonar causada por *Ureaplasma* spp.

*Ureaplasma* spp. e *M. hominis* também podem estar envolvidos em casos de meningite no recém-nascido, apresentando, no exame do liquor, perfil semelhante ao encontrado em infecções bacterianas.

Existem evidências do envolvimento de *M. hominis* em casos de doença pélvica inflamatória (PID), tendo sido isolado em aproximadamente 10% das mulheres com salpingite diagnosticada por laparoscopia, estando ainda bem estabelecido seu papel na etiologia das vaginoses bacterianas.<sup>9</sup>

*M. hominis* tem sido também isolado em 10% das hemoculturas de pacientes com febre pós-parto, tendo sido detec-



**Figura 16.4** Esquema do envolvimento de *Ureaplasma* spp. na patogênese da displasia broncopulmonar. Adaptada de Waites *et al.*, 2005.<sup>41</sup>

tados anticorpos anti-*M. hominis* em praticamente todos os casos. Platt *et al.* relataram uma associação entre o aumento de 4 vezes nos níveis de anticorpos micoplásmicos e a elevação de temperatura após parto vaginal.<sup>41</sup>

## Diagnóstico laboratorial

### Cultura

Dentre os métodos para o diagnóstico tanto de *M. hominis* quanto de *Ureaplasma* spp., as técnicas de cultivo são ainda as preconizadas. Para tanto, dentre as amostras clínicas a serem utilizadas, destacam-se o material do fundo de saco de Douglas e o material cervical, ambos obtidos após remoção do material vaginal com solução fisiológica estéril. Para a coleta, poderão ser utilizados swabs neutros, não sendo recomendado o uso de cotonetes. O material assim obtido deverá ser colocado em meio de transporte A<sub>3xb</sub> e processado, podendo ser mantido em geladeira por no máximo 48 h, não tendo sido observadas perdas significativas na viabilidade dos microrganismos. A semeadura, seguida de incubação em microaerofilia, deverá ser feita nos meios líquidos U<sub>10</sub> (para ureaplasmas) e MLA (meio líquido de arginina para *M. hominis*) seguida da caracterização colonial em meio sólido A<sub>7</sub>. Os meios utilizados A<sub>7</sub> e U<sub>10</sub> podem ser adquiridos comercialmente e a identificação deverá ser seguida de quantificação dos isolados pela técnica de microtitulação. A Figura 16.5 apresenta algumas colônias das espécies *M. hominis* e *Ureaplasma* spp. em meio sólido A<sub>7</sub>.<sup>56,57</sup>

Vários são os kits existentes em nosso meio, podendo ser citados os da International Microbio, que comercializa o Mycofast®, o Mycoplasma® DUO da Sanofi Pasteur, França, e o Mycoplasma® IST da BioMérieux, França. Tais testes possibilitam, além da identificação da espécie e quantificação da mesma, a demonstração da sensibilidade da espécie frente a determinados antibióticos.

No mercado pode ser encontrado o kit Mycofast® ABG, International Microbio, o qual fornece o antibiograma da cepa testada, correlacionando-o com os valores do MIC (concentração inibitória mínima).

### Deteção de anticorpos

Considerando a baixa imunogenicidade dos micoplasmas no trato geniturinário, métodos que envolvem a detecção de





**Figura 16.5** **A.** Colônias de *Ureaplasma* spp. em meio sólido A<sub>7</sub> (aumento de 400×). **B.** À esquerda, colônia de *Mycoplasma hominis* e, à direita, numerosas colônias de *Ureaplasma* spp. (conc. >10<sup>3</sup> UFC/mL), envolvendo células do epitélio cervical. **C.** Colônias de *Mycoplasma hominis* em meio sólido A<sub>7</sub> (aumento 100×). Cortesia do Laboratório de Micoplasmologia da FCF-USP.

anticorpos não tiveram êxito na rotina diagnóstica. Alguns dos métodos para o sorodiagnóstico tiveram sua utilização limitada em razão da não concordância entre o número de microrganismos isolados e a detecção de anticorpos séricos. É importante ressaltar a importância da titulação dos isolados de amostras clínicas do trato geniturinário, uma vez que é alta a frequência com que o microrganismo aparece como mero colonizador.

Desta maneira, somente as taxas de infecção significantes deverão ser consideradas e, no caso de detecção de anticorpos, não fica clara a relação entre colonização *versus* anticorpos *versus* doença.

Apesar disso, alguns autores têm tentado correlacionar a detecção de altos títulos de anticorpos anti-*Ureaplasma* spp. em gestantes com resultados adversos da gestação.<sup>58</sup>

As técnicas sorológicas contribuem de alguma maneira para o diagnóstico quando a infecção ureaplásmica ocorre em outras regiões anatômicas, como, por exemplo, nos casos de pneumonias neonatais e septicemias.

Dentre as técnicas existentes, as mais frequentemente utilizadas são o ELISA e a técnica de inibição de metabolismo. No ELISA os valores considerados positivos variam com a padronização de cada laboratório, uma vez que ainda não se dispõe de kits comerciais. Por outro lado, a International Microbio comercializa o kit Mycofast® screening evolution 2 complement, cujo princípio do método é o da inibição de metabolismo. Esta técnica, contudo, poderá sofrer leve interferência durante o tratamento dos pacientes, decorrente da medicação empregada.

### Técnicas moleculares

► **PCR.** A utilização da PCR também tem sua aplicação nos casos em que a quantificação do microrganismo não é necessária e em que os achados de *Ureaplasma* spp. e/ou *M. hominis*, por si sós, sejam indicativos de doença. Vários são os primers utilizados para identificação de tais espécies e em esquemas de sorotipagem para *Ureaplasma* spp. Neste último caso, o emprego de algoritmos adequados pode caracterizar a maioria dos sorotipos, possibilitando atribuir a real representatividade das espécies *U. parvum* e *U. urealyticum* no quadro das doenças do trato geniturinário.<sup>51,59</sup>

► **PCR em tempo real (real time PCR).** Testes de PCR em tempo real têm sido otimizados para detectar tanto as espécies *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis*, em amostras do trato urogenital e também em outras amostras clínicas.<sup>60,61</sup>

## ■ Espécies menos frequentemente isoladas do trato urogenital

### *Mycoplasma genitalium*

Descrito pela primeira vez em 1981, após seu isolamento de amostras uretrais de dois indivíduos homossexuais, tem no seu cultivo um desafio constante. Apesar da tentativa de utilização de sondas de DNA para sua detecção, a PCR demonstrou ser mais sensível.<sup>62</sup>

### Patogênese

Em indivíduos com uretrites não gonocócicas e com PCR positiva para *M. genitalium*, tem sido detectada, por ELISA, a presença de anticorpos anti-*M. genitalium*, o mesmo não tendo sido observado em indivíduos livres de uretrites e com PCR negativa. Vários trabalhos têm sugerido estar este microrganismo fortemente associado a casos de uretrite não gonocócica aguda. Na mulher, não parece estar associado à vaginose bacteriana, apesar de ser detectado por PCR no trato genital feminino inferior de pacientes sob tratamento em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis em taxas de 7 a 20%.<sup>63</sup>

Sua detecção por meio da PCR em tempo real tem sido utilizada principalmente em casos de determinação de especificidade do teste.<sup>39</sup>

Em decorrência de seu isolamento também de amostras do trato respiratório e de seu imenso potencial patogênico, seu real papel nas doenças respiratórias deve ser considerado. Contudo, as semelhanças antigênicas com *M. pneumoniae* têm dificultado a interpretação dos testes sorológicos em consequência da observação de reações cruzadas.<sup>64</sup>

Deste modo, a detecção da espécie em amostras uretrais de pacientes com queixa clínica de DST tem sido pelo menos um indicativo da sua participação nas doenças do trato geniturinário.

## ■ Micoplasmas como cofatores do HIV | *M. fermentans*, *M. pirum* e *M. penetrans*

A persistência do HIV no hospedeiro está associada ao estado de ativação crônica do sistema imune e cuja progressão varia de um indivíduo para outro.

Dentre os fatores propostos que justificariam tais diferenças, estão: aqueles relativos ao vírus (diferenças de virulência entre as cepas do HIV, carga viral etc.), ao hospedeiro (idade, genética, vias de inoculação, história de vida) e à coexistência com outros agentes infecciosos. Embora haja uma estimulação



do sistema imune durante um processo infeccioso, no caso de a infecção pelo HIV esta ativação persiste, assumindo um caráter de cronicidade responsável por graves efeitos deletérios no hospedeiro.

Definidos como agentes oportunistas, os micoplasmas têm sido considerados cofatores do HIV, após análise do caráter silente e da cronicidade das infecções, aliada a maior soroprevalência de determinadas espécies em indivíduos portadores de AIDS.<sup>65, 66</sup>

*M. fermentans*, *M. pirum* e *M. penetrans* têm sido as espécies mais frequentemente relacionadas com a coinfeção, podendo levar a drásticos efeitos modulatórios sobre o sistema imune, pela indução de ativação de linfócitos T ou B, secreção de citocinas e/ou pela produção de superantígenos. Segundo Nir-Paz *et al.*, componentes de membrana de *M. penetrans* e *M. fermentans* podem ativar *in vitro* a expressão gênica do HIV de maneira dependente da região LTR; isto seria consequência do acúmulo de radicais livres de oxigênio, resultando na elevação de NF- $\kappa$ B, ativador do HIV por esta região.<sup>67, 68</sup>

### Epidemiologia e diagnóstico laboratorial

*M. fermentans* foi a primeira espécie de micoplasma isolada de paciente com AIDS, e a denominação *M. incognitus* a ele atribuída inicialmente passou a ser a denominação de uma variante da espécie, *M. fermentans* var. *incognitus*. Seguiram-se vários isolamentos de *M. fermentans* tanto em pacientes HIV-positivos como também em HIV-negativos, deixando dúvidas quanto a sua importância na patogênese das doenças humanas. Estas dúvidas até hoje permanecem, razão da necessidade de intensificação de estudos sobre a espécie.

Duas outras espécies de micoplasmas foram também isoladas de pacientes HIV-positivos. Enquanto *M. pirum* foi raramente detectado em sangue de pacientes HIV-positivos, *M. penetrans*, pela frequência e pelo grande potencial patogênico demonstrado *in vitro*, parece ser um forte candidato a cofator do HIV.<sup>65</sup>

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado alta frequência de anticorpos anti-*M. penetrans* associada a pacientes HIV-infectados (20 e 40% em pacientes sem sintomas e com AIDS, respectivamente), quando comparada a indivíduos HIV-negativos (0,3 a 15,5%) por ELISA usando LAMP (*lipid associated membrane proteins*) como antígeno, sendo as proteínas de 38 e 42 kDa as imunodominantes.<sup>69</sup>

### Deteção de anticorpos

Em estudos recentes realizados no Brasil por nosso grupo, detectaram-se, por meio de ELISA-LAMP, em indivíduos HIV-positivos, as seguintes taxas de anticorpos anti-*M. penetrans*: IgG em 25,5%, IgM em 3,8% e IgA em 15,1%. Tais resultados comparados com aqueles obtidos com um grupo DST e grupo controle revelaram os valores: 17,3% para IgG; 9,1% para IgM; 17,3% para IgA; e de 1,2% para IgG; 5,8% para IgM; e 1,2% para IgA, respectivamente. Quanto aos níveis de IgG, não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos HIV-positivo e DST, sendo significativamente mais alta que o grupo controle. Para IgM não houve diferenças estatísticas significativas entre os três grupos. Referindo-se aos níveis de IgA, tanto no grupo HIV-positivo quanto no grupo DST, foram significativamente mais altas do que aquelas observadas no grupo controle, não havendo diferenças, contudo, entre si. Apesar de vários de nossos resultados com pacientes HIV-positivos serem concordantes com os observados na literatura internacional, o mesmo não se observou quando foi analisado o grupo DST.<sup>69</sup>

### Cultura

As técnicas de cultivo têm se mostrado fastidiosas e muitas vezes ineficientes para o diagnóstico de algumas espécies emergentes, tais como *M. genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans*. Os meios de cultura utilizados são complexos e pouco ou nenhum é o sucesso de isolamento de tais espécies. Diante das dificuldades inerentes ao cultivo, as técnicas de biologia molecular são o principal instrumento disponível de detecção destas espécies. O Quadro 16.2 mostra alguns exemplos de aplicação da PCR para detecção de micoplasmas.

Diante das inúmeras evidências do envolvimento dos micoplasmas nas doenças humanas, alicerçadas em seus fatores de virulência e nos altos índices de infectividade, fica clara a importância de seu estudo.

O emprego de técnicas moleculares deu uma nova luz no diagnóstico das várias espécies humanas, possibilitando a detecção desses microrganismos em diferentes amostras clínicas, possibilitando melhor visualização entre a sua presença e a doença.

**Quadro 16.2 • PCR de micoplasmas e respectivas sequências detectadas.**

Micoplasma	Sequência detectada	Referências bibliográficas
<i>M. pneumoniae</i>	Adesina P1	70, 71
<i>M. genitalium</i>	Adesina MgPa	71, 72, 73
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Gene urease Gene 16S rRNA	45
<i>Ureaplasma parvum</i>	MBA	59
<i>M. fermentans</i>	Elemento IS-like	74
<i>M. hominis</i>	Gene 16S rRNA	75, 76
<i>M. penetrans</i>	Gene 16S rRNA	75
<i>M. pirum</i>	Gene 16S rRNA	77

Adaptado de Bébér *et al.*, 1997.<sup>64</sup>



## ► Referências bibliográficas

- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 20 de maio, 2010 (publicado on-line).
- Morowitz HJ, Tourtellotte ME. The smallest living cells. *Sci Am* 1962; 206: 117-125.
- Nocard E, Roux ER. Le microbe de la peripneumoniae. *Ann Inst Pasteur* 1898; 12: 240-262.
- Waites KB, Balish FM, Atkinson PT. New insights into pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol* 2008; 3 (6): 635-648.
- Razin S. Structure and function in mycoplasma. *Ann NY Acad Sci* 1969; 143: 115-129.
- Cunha RAF, Koiffman CP, Souza DH *et al.* Clastogenic effects of *Ureaplasma urealyticum* on human chromosomes. *Braz J Biol Med Res* 1997; 30: 749-757.
- Tsai S, Wear DJ, Shih JWK *et al.* Mycoplasma and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 10197-10201.
- Razin S, Yegorov D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Molec Biol Rev* 1998; 62: 1094-1156.
- Waites KB, Schelonka RL, Xiao L *et al.* Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2009; 14:190-199.
- Razin S. Adherence of Pathogenic mycoplasmas to host cells. *Bioscience Reports* 1999; 19: 367-372.
- Judlin P. Mycoplasmas génitaux. *Gynecol Obstet Fertil* 2002; 31: 954-959.
- Ladefoged S. Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. *APMIS* 2000; 108: 5-45.
- Eaton MD, Meikejohn G, Herick WV. Studies on the etiology of primary atypical pneumoniae: a filtrable agent transmissible cotton rats, hamsters and chick embryos. *J Exp Med* 1944; 79: 649-667.
- Cunha CB. The first atypical pneumoniae: the history of the discovery of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Dis Clin N Am* 2010; 24: 1-5.
- Waites KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 697-728.
- Taylor P. Medical significance of mycoplasmas. In: Miles RJ, Nicholas RAJ. *Methods in molecular biology*, vol. 104. *Mycoplasma Protocols*; Totowa NJ: Humana Press Inc., 1999.
- Jacobs SE. Mykoplasma infections of the human respiratory tract. *Wien Klin Wochensche* 1997; 109: 574-577.
- Johnston CLW, Webster ADB, Taylor-Robinson D *et al.* Primary late-onset hypogammaglobulinemia associated with inflammatory polyarthritis and septic arthritis due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Ann Rheum Dis* 1983; 42: 108-110.
- Lyell A, Gordon AM, Dick HM. Mycoplasmas and erythema multiforme. *Lancet*, 1967 1116-1118.
- Taylor-Robinson D, Gumpel JM, Hill A *et al.* Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from synovial fluid of a inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 1978; 37:180-182.
- Hanukoglu A, Hebroni S, Fried D. Pulmonary involvement in *Mycoplasma pneumoniae* infection in families. *Infection* 1986; 14: 1-6.
- Jacobs E. *Mycoplasma pneumoniae* virulence factors and the immune response. *Rev Med Microbiol* 1991; 2: 83-90.
- Kraybill WH, Crawford YE. A selective medium and colour test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 118: 965-970.
- Purcell RH, Taylor-Robinson D, Wong DC *et al.* A color test for the measurement of antibody to the non-acid-forming human mycoplasma species. *Am J Epidemiol* 1966; 84: 51-66.
- Louless RW, Griffith S, Fryer PR *et al.* Immunoelectron microscopic studies reveal differences in distribution of sialo-oligosaccharide receptors for *Mycoplasma pneumoniae* on the epithelium of human and hamster bronchi. *Infect Immun* 1992; 60: 4015-4023.
- Feizi T. Carbohydrates and the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* infection and AIDS-some observations and speculations. *Clin Inf Dis* 1993; 17: S63-S65.
- Senterfit LB, Pollack JD, Somerson NL. Antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*: correlation of complement fixation and tetrazolium reduction inhibition tests. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140: 1294-1297.
- Aubert G, Pozzetto B, Gaudin OG *et al.* Evaluation of five commercial tests: complement fixation, microparticle agglutination, indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination, in comparison to immunoblotting for *Mycoplasma pneumoniae* serology. *Ann Biol Clin* 1992; 50: 593-597.
- Hers JFP. Fluorescent antibody technique in respiratory viral diseases. *Am Rev Respir Dis* 1963; 88: 316-338.
- Granström M, Holme T, Sjogren AM *et al.* The role of IgA determination by ELISA in the early serodiagnostics of *Mycoplasma pneumoniae* infection, in relation to IgG and  $\mu$ -capture IgM methods. *J Med Microbiol* 1994; 40: 288-292.
- Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; 109: 129-135.
- Jacobs E, Fuchte K, Bredt W. A 168 kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae* used as antigen in a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5: 435-440.
- Papierok G, Defives C, Daunizeau A *et al.* Preparative electroelution of specific protein antigens from *M. pneumoniae*: use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1988; 139: 589-603.
- Jacobs E, Pilatschek A, Gerstenecker G *et al.* Immunodominant epitopes of the adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1194-1197.
- Alexander AG, Lowes HR, Kenny GE. Identification of a mycoplasmal protein which binds immunoglobulins non immunologically. *Infect Immun* 1991; 59: 2147-2151.
- Vu AC, Foy HM, Cartwright FD *et al.* The principal protein antigens of isolates of *Mycoplasma pneumoniae* as measured by levels of immunoglobulin G in human serum are stable in strains collected over a 10-year period. *Infect Immun* 1987; 55: 1830-1836.
- Razin S, Yegorov D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Molec Biol Rev* 1998; 62: 1094-1156.
- Bernet C, Garret M, Barbeyrac B *et al.* Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2492-2496.
- Winchell JM, Thurman KA, Mitchell SL *et al.* Evaluation of three-real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in outbreak investigation. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3116-3118.
- Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 2003; 83: 417-432.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 757-789.
- Platt R, Lin JS, Warren JW *et al.* Infection with *Mycoplasma hominis* in postpartum fever. *lancet* 1980; 2: 1.217-1.221.
- Dienes L, Edsall G. Observations on the L-organism of Klienberger. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937; 36: 740-744.
- Christiansen C, Christiansen G, Rasmussen F. Heterogeneity of *Mycoplasma hominis* as detected by a probe for atp genes. *Isr J Med Sci* 1987; 23: 591-594.
- Jensen LT, Thorsen P, Moller B *et al.* Antigenic and genomic homogeneity of successive *Mycoplasma hominis* isolates. *J Med Microbiol Edinburgh*, 1998; 47: 659-666.
- Blanchard A, Hentschel J, Duffy L *et al.* Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis* 1993; 17 [S] 1: S48-53.
- Passadore LF, Cunha RAF. Caracterização das espécies *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis* através do cultivo e da PCR e detecção da heterogeneidade gênica da espécie *Mycoplasma hominis* por RAPD em amostras clínicas. Tese de mestrado obtida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2005.
- Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L *et al.* Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genetics* 2009; 5: 1-13.
- Kasper DC, Mechtler TP, Reischer GH *et al.* The bacterial load *Ureaplasma parvum* in amniotic fluid is correlated with an increased intrauterine inflammatory response. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 117-121.
- Taylor-Robinson D. Infection due to *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An update. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 671-684.
- Clyde WA, McCormack WM. Collection and transport specimens. In: Razin S, Tully JG (eds). *Methods in mycoplasmaology*. N.Y. Academic Press, 1983; vol. 1:103-7.
- Segonds C, Francoval D, Assemekang B *et al.* Mycoplasmas et grossesse-étude préliminaire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1992; 21: 385-392.
- Bracco G, Sanso G, Molinaro CG. Ruolo del *Mycoplasma hominis* nelle infezioni acute dell'apparato genitale femminile. *Minerva Ginecol* 1990; 42: 59-63.
- Copin E, Lebrun L. Infezioni à mycoplasmes urogénitales. *Feuill Biol* 1991; 32: 9-15.
- Romero MRJ, Avila C, Foster JT *et al.* Prostaglandins production by amnion and decidual cells in response to bacterial products. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 1991; 42 (3): 167-169.



55. Friberg J. Mycoplasmas and ureaplasmas in infertility and abortion. *Fertil Steril* 1980; 33(4): 351-359.
56. Shepard MC, Lunceford CD. Differential agar medium (A<sub>7</sub>) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasma) in primary cultures of clinical material. *J Clin Microbiol* 1976; 3: 613-625.
57. Shepard MC. Standard fluid medium U<sub>10</sub> for cultivation and maintenance of *U. urealyticum*. *Int J Syst Bacteriol* 1974; 24: 160-171.
58. Horowitz S, Mazor M, Horowitz J *et al.* Antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in women with intra-aminotic infection and adverse pregnancy outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 132-136.
59. Kong F, Zhenfang MA, Gregory J *et al.* Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1175-1179.
60. Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J *et al.* Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol* 2004; 4: 35-59.
61. Cao X, Jiang Z, Wang Y *et al.* Two multiplex real-time TaqMan polimerase chain reaction systems for simultaneous detecting and serotyping of *Ureaplasma parvum*. *Diag Microbiol Infec Dis* 2007; 59: 109-111.
62. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM *et al.* A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1981; 1: 1288-1291.
63. Taylor-Robinson D. The Harrison lecture-The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmitted diseases. *Genitourin Med* 1995; 71: 1-8.
64. Bébéar C, Barbeyrac B, Bébéar CM *et al.* New developments in diagnostic and treatment of mycoplasma infection in humans. *Wien Klin Wochenschr* 1997; 109: 594-599.
65. Blanchard A. Mycoplasmas and HIV infection, a possible interaction through immune activation. *Wien Klin Wochenschr* 1997; 109: 590-593.
66. Montaigner L, Blanchard A. Mycoplasmas as cofactors in infection due to the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 309-315.
67. Iyama K, Ono S, Kuwano K *et al.* Induction of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and enhancement of HIV-1 replication in the J22HL60 cell line by *Mycoplasma penetrans*. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 907-914.
68. Nir-Paz R, Israel S, Honigman A *et al.* Mycoplasmas regulate HIV-LTR-dependent gene expression. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128: 63-68.
69. Cordova CMM, Takei K, Rosenthal C *et al.* Evaluation of IgG, IgM and IgA antibodies to *Mycoplasma penetrans* detected by ELISA and immunoblot in HIV-1-infected and STD patients in São Paulo, Brazil. *Microbes and Infection* 1999; 1: 1-7.
70. Jensen JS, Sondergard-Andersen J, Uldum SA *et al.* Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical samples by polymerase chain reaction. *APMIS* 1989; 97: 1046-1048.
71. De Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Febrer F *et al.* Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1993; [S1]: S83-89.
72. Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 46-50.
73. Palmer HM, Gilroy CB, Furr PM *et al.* Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 77:199-204.
74. Wang RYH, Hu WS, Dawson MS *et al.* Selective detection of *Mycoplasma fermentans* by polymerase chain reaction and by using a nucleotide sequence within the insertion sequence-like element. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 245-248.
75. Grau O, Kovacic R, Griffais R *et al.* Development of PCR-based assays for detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *Mycoplasma hominis*. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 139-148.
76. Blanchard A, Yanez A, Dybivig K *et al.* Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16SrRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1358-1361.
77. Grau O, Kovacic R, Griffais R *et al.* Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma pirum*. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 106: 327-334.



## Capítulo 17

---

# Leptospirose Humana

*Marcos Vinícius da Silva,  
Eide Dias Camargo e  
Regina Célia Rodrigues  
de Moraes Abdulkader*

- Introdução, 219
- Diagnóstico laboratorial, 220
- Bibliografia, 225



## ► Introdução

A leptospirose é uma antropozoonose encontrada em praticamente todas as regiões do planeta. Incide com maior frequência nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais são propícias para que ocorra a sua manutenção e a transmissão da cadeia epidemiológica. Acarreta sérios danos à saúde humana e veterinária, com repercussões econômicas e, consequentemente, sociais.

Recentemente, a leptospirose foi reconhecida como uma das doenças infecciosas reemergentes, tanto nos países desenvolvidos, industrializados, como nos em desenvolvimento.

A doença em humanos foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo, por Larrey, embora haja evidências de sua ocorrência há muito mais tempo. Em 1886, Adolf Weil a descreveu como síndrome, e somente em 1915, o seu agente etiológico foi isolado por Inada e Ido. Nesse mesmo ano, Miyasjima constatou a presença de espiroquetas nos rins de ratos do campo (*Microtus montebelloi*), concluindo que os ratos do campo e domésticos eram os reservatórios naturais das leptospirosas.

As leptospirosas são bactérias aeróbicas estritas, da ordem Spirochaetales, da família Leptospiraceae e do gênero *Leptospira*. Estas bactérias têm forma helicoidal, com uma ou ambas as extremidades em formato de gancho, medindo de 10 a 20 µm de comprimento; são delgadas, móveis, propelidas por dois flagelos (FlaA e FlaB) contidos no envelope externo (periplasmáticos), responsáveis pela motilidade.

O envelope externo é composto por proteínas, lipídios e lipopolissacarídeos, concentrando grande parte dos seus antígenos. As espécies classicamente aceitas são 13 patogênicas para o homem e animais: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomaespécie 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirscheneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomaespécie 3), *L. weilii* e *L. wolffii*, com mais de 260 sorovares. As não patogênicas (saprófitas) são seis: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomaespécie 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomaespécie 4) e *L. wolbachii* com mais de 60 sorovares. A classificação da sorovariedade de leptospira é fundamentada na expressão dos epitopos de superfície, formando um mosaico de antígenos lipopolissacarídicos (LPS), em que a especificidade de cada epitopo depende da composição e da orientação de cada açúcar. Os LPS são considerados os principais antígenos dessas bactérias, estrutural e imunologicamente similares aos dos microrganismos gram-negativos.

As leptospirosas são mantidas na natureza principalmente nos mamíferos, embora já tenha sido isolada de répteis, anfíbios, peixes, pássaros e invertebrados. Estes animais, tanto os silvestres como os domésticos, podem tornar-se portadores das leptospirosas por longos períodos ou até mesmo por toda a vida, albergando-as no aparelho urinário e eliminando-as pela urina para o meio ambiente, constituindo fonte de infecção para animais suscetíveis, inclusive o homem. O homem é elemento acidental e casual, fechando o ciclo e interrompendo a cadeia de transmissão da leptospirose; ele não se torna portador da bactéria.

No Brasil, as características epidemiológicas da leptospirose são diferentes daquelas encontradas em outros locais, onde ela é predominantemente doença profissional ou recreacional, na forma epidêmica. Neste país, a doença é endêmica nos grandes centros urbanos, com exacerbações epidêmicas em determinadas épocas do ano, por ocasião das grandes enchentes. A transmissão da doença pode ocorrer de maneira direta pela

mordedura, contato com sangue, tecidos, órgãos e urina de animal infectado ou de maneira indireta, a mais frequente, pelo contato com água, lama, solo e vegetação úmidos, lixo e alimentos contaminados com leptospirosas íntegras. A infecção inter-humana e congênita pode ocorrer, embora seja raramente observada. A leptospirose acomete com maior frequência adultos jovens na faixa etária de 20 a 40 anos e caracteriza-se por sintomas como febre, cefaleia, calafrios, mialgia, sufusão conjuntival e menos frequentemente por meningite, erupção cutânea, icterícia e insuficiência renal. Essas últimas fazem parte da forma grave da doença.

Os sintomas, na fase aguda, podem ser bifásicos: a primeira fase é a septicêmica, com duração de 4 a 7 dias, e a segunda, imunológica, que pode durar de 1 a 3 semanas, cujas características são o desaparecimento das leptospirosas da corrente sanguínea e o início da eliminação dessas bactérias pela urina. Na segunda fase, há a participação da imunidade, principalmente a humoral.

As leptospirosas patogênicas penetram através da pele e das mucosas, alcançam rapidamente a corrente sanguínea e, subsequentemente, todos os sítios orgânicos, incluindo o sistema nervoso central e o humor aquoso.

As toxinas e as enzimas produzidas pelas leptospirosas participam na fisiopatogenia da doença, que tem como substrato a agressão do endotélio vascular e a lesão capilar, resultando em intensa vasculite generalizada.

O período de incubação da leptospirose dura em média de 10 a 14 dias, com extremos de 2 a 26 dias. O início da doença é súbito, e o acometimento orgânico, muito variado, podendo ocorrer infecção assintomática, mas leve, com sintomas parecidos com os da gripe e de involução espontânea, ou infecção grave, que ocorre em 5 a 10% dos indivíduos infectados, em que podem estar presentes mialgia generalizada decorrente da rabdomiólise, fenômenos hemorrágicos graves associados a plaquetopenia, hipovolemia, hipotensão, icterícia, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda, hemoptise que pode evoluir de forma maciça e asfíxiante, miocardite, arritmias cardíacas, meningite, encefalite e acometimento de outros órgãos que também podem levar à morte.

As manifestações clínicas da leptospirose são pleomórficas, determinando amplo espectro de sinais e sintomas, passíveis de serem confundidas com outras patologias, e nem sempre tais manifestações clínicas fornecem ao médico informação que o faça pensar nesta doença. Na maioria das vezes, a hipótese diagnóstica de leptospirose somente é estabelecida após adequada investigação dos antecedentes epidemiológicos do paciente.

Os critérios diagnósticos indicativos para leptospirose humana preconizados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC – Atlanta, EUA) são:

- Isolamento da leptospira em cultura
- Aumento em 4× ou mais nos títulos da reação de aglutinação para leptospira em amostras de soro obtidas nas fases aguda e de convalescença, coletadas com intervalo de tempo igual ou maior do que 2 semanas, processadas no mesmo laboratório
- Visualização da leptospira por imunofluorescência em amostra clínica.

Em países como o Brasil, onde em muitas regiões não se dispõe de laboratório de saúde pública ou se tem dificuldade para enviar as amostras biológicas ao laboratório de referência, contudo, os critérios aceitos para confirmação diagnóstica são mais flexíveis.



Os critérios para confirmação do caso suspeito preconizado pelo Ministério da Saúde são:

- Isolamento da bactéria em material biológico (sangue, urina ou liquor)
- Soroconversão, em 2 ou 3 amostras séricas coletadas com intervalos de 15 dias, e aumento dos títulos de 4 ou mais vezes na reação de microaglutinação (MAT).

Quando não houver disponibilidade de 2 ou mais amostras, um título igual ou superior a 1:800 na MAT confirma o diagnóstico. Títulos menores, entre 1:100 e 1:800, devem ser considerados de acordo com a situação epidemiológica local:

- A macroaglutinação (SAT) ou ELISA-IgM positivos confirmam o caso, quando não for possível a realização da MAT.

Os casos suspeitos que evoluem para o óbito sem confirmação laboratorial poderão ser confirmados pela técnica de imuno-histoquímica para leptospirose em amostras de tecido.

O tratamento dessa doença continua sendo a penicilina, e, nos casos em que esteja contraindicada, a segunda opção terapêutica é a ampicilina, a doxicilina ou a tetraciclina. Também a ceftriaxona tem mostrado bom resultado terapêutico.

A morbidade e a mortalidade diminuem com a implementação de técnicas rápidas de diagnóstico que possibilitam o reconhecimento precoce da doença e consequentemente a instituição também precoce de medidas terapêuticas.

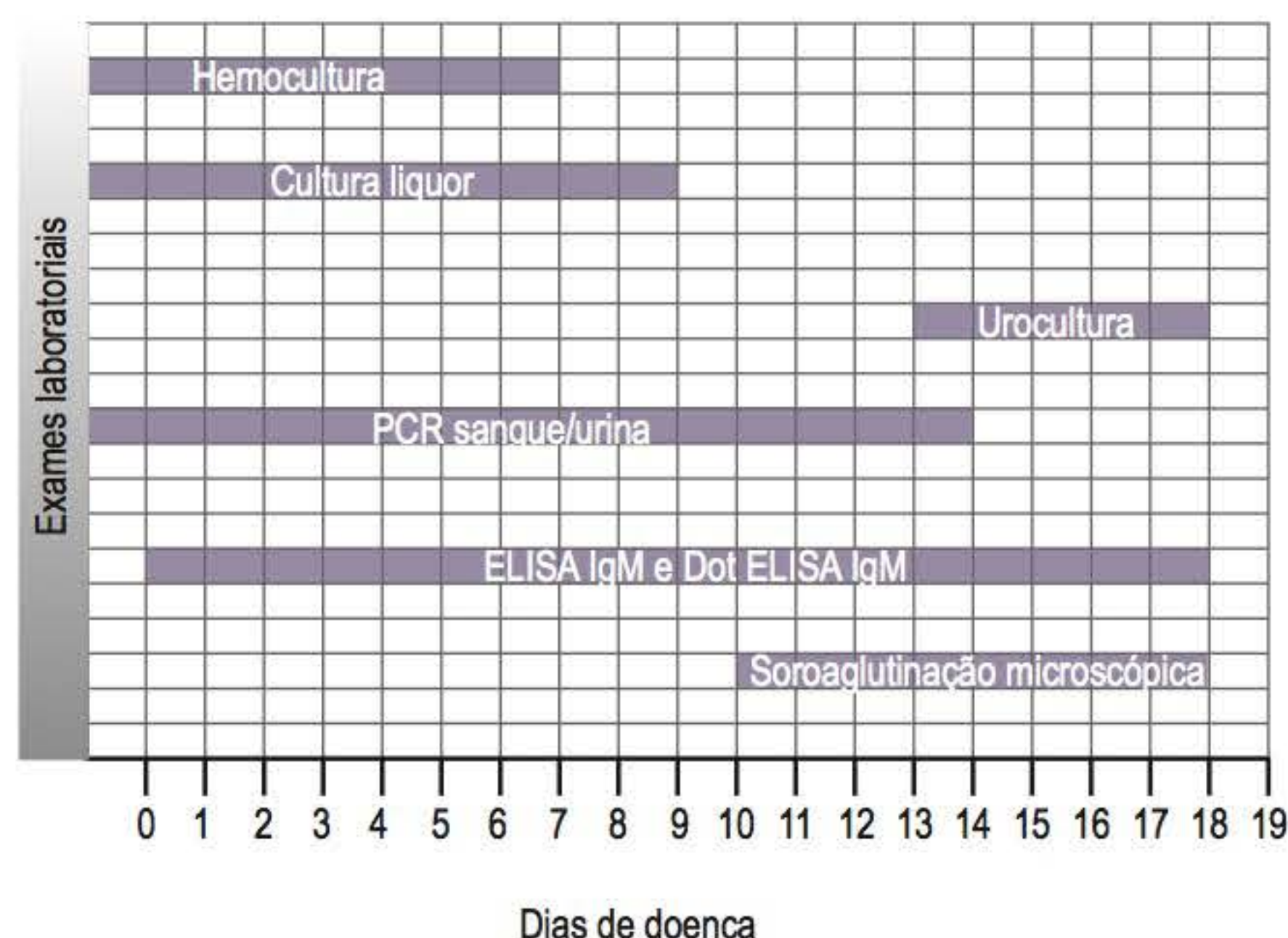
## ► Diagnóstico laboratorial

Os exames laboratoriais na leptospirose humana são de grande importância no diagnóstico, uma vez que as manifestações clínicas são polimórficas, com grande diversidade de sinais e sintomas, o que dificulta a confirmação diagnóstica somente pela clínica, principalmente quando os antecedentes epidemiológicos são vagos.

Os materiais biológicos utilizados para diagnosticar essa importante zoonose são: sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), urina, saliva, exsudato peritoneal e pleural, bem como tecidos. Para que o diagnóstico laboratorial seja bem-sucedido, é importante observar técnicas adequadas de coleta e de transporte dos materiais biológicos.

Para a solicitação dos exames laboratoriais, é preciso considerar que a doença apresenta comportamento bifásico. Na fase inicial, septicêmica, as leptospirosas podem ser encontradas no sangue, LCR e na maioria dos tecidos. Na segunda fase, imunológica, há o aparecimento dos anticorpos séricos específicos circulantes e também a eliminação das leptospirosas na urina. As leptospirosas podem se instalar no humor aquoso e no parênquima renal por longos períodos. Para a escolha dos exames e a validação dos resultados, deve-se observar em qual das duas fases o paciente se enquadra e direcionar adequadamente a solicitação de exames, segundo a fase clínica (Figura 17.1). Assim, na primeira fase, deve-se buscar isolar a leptospirose, enquanto, na segunda, o diagnóstico pode ser comprovado somente pela resposta imunológica do indivíduo infectado.

Os métodos laboratoriais empregados dividem-se em diretos e indiretos. Os diretos são aqueles capazes de detectar o agente etiológico, íntegro ou não, viável ou inviável. Os métodos indiretos podem detectar marcadores imunológicos (anticorpos) específicos, produzidos pelo hospedeiro em resposta ao estímulo imunogênico determinado pelos diferentes epítopos antigênicos encontrados nas leptospirosas.



**Figura 17.1** Diagnóstico laboratorial, conforme a evolução das fases da leptospirose humana.

## ▪ Métodos diretos para pesquisa do agente etiológico no material biológico

### *Microscopia de campo escuro ou técnicas de coloração de Giemsa ou de impregnação pela prata*

Essas técnicas não são recomendáveis devido às baixas sensibilidade e especificidade que fornecem, acarretando riscos de as leptospirosas serem confundidas com filamentos de fibrina e proteína e/ou restos de estruturas celulares do indivíduo.

### *Imunofluorescência*

Imunofluorescência empregando anticorpos monovalentes ou polivalentes antileptospira marcados com isotiocianato de fluoresceína e leitura em microscópio de fluorescência. Este método é pouco empregado por apresentar especificidade e sensibilidade inferiores às dos métodos de microaglutinação (*microscopic agglutination test* – MAT) e *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

## ▪ Cultura para leptospirosas

O material biológico deve ser coletado em condições adequadas, por meio de técnicas assépticas, preferencialmente antes da introdução de antibióticos.

### *Hemocultura*

Deve-se coletar 0,1 a 0,5 mL (1 a 20 gotas) de sangue e inoculá-lo em 3 a 4 tubos contendo meio de cultura próprio para leptospirosas, meio semissólido de Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH), de Fletcher, Korthoff, Noguchi ou de Stuart, recentemente preparados. Volume grande de sangue semeado no meio de cultura pode inibir o crescimento, pela presença de anticorpos e/ou de antibióticos, e, para que isso não ocorra, há necessidade de diluir o sangue no meio de cultura. Recomenda-se a coleta do sangue nos primeiros 5 dias de sintomas e a semeadura da seguinte maneira: nos tubos contendo 5 mL do meio de cultura à temperatura ambiente, semeia-se 1 gota de sangue no primeiro tubo, 2 no segundo, 5 no terceiro e 10 no quarto. As culturas devem ser incubadas em estufa com temperatura entre 28 e 30°C, pois as leptospirosas sobrevivem pouco em meio de cultura a 37°C. Inicialmente, a hemocultura deverá ser inspecionada 1, 3 e 5 dias após a semeadura



para certificar-se de que não houve contaminação e se está havendo crescimento de leptospira. O crescimento de contaminantes na cultura de material biológico pode ser inibido acrescentando-se ao meio de cultura 5-fluoruracila, gentamicina, ácido nalidíxico ou rifampicina. As culturas devem ser observadas durante 30 dias, uma vez que pequenos inóculos e cepas com pouca capacidade adaptativa ao meio de cultura podem levar maior tempo para o crescimento. As culturas somente poderão ser desprezadas após 13 semanas de observação. As culturas negativas somente deverão ser desprezadas após exame final cuidadoso, incluindo microscopia de campo escuro. A hemocultura é muito importante, pois o isolamento da leptospira tornará possível a posterior identificação do sorogrupo e do sorovar infectante.

Os tubos que apresentarem crescimento das leptospiras devem ser imediatamente repicados em outros dois tubos contendo meio de cultura recém-preparado, pois culturas primárias positivas podem, posteriormente, tornar-se não viáveis. O ideal é repicar todas as culturas primárias 1 a 2 semanas após a semeadura e essas subculturas serem também examinadas semanalmente.

### LCR

Leptospiras podem ser isoladas do LCR nos primeiros 5 a 10 dias de doença. Deve-se semear 0,5 mL de LCR em 5 mL do meio de cultura semissólido (Fletcher).

### Urina

Deve ser coletada assepticamente, a partir da segunda semana de doença, se possível previamente alcalinizada, pois as leptospiras morrem rapidamente em contato com a acidez da urina. A alcalinização da urina pode ser obtida ministrando-se ao paciente bicarbonato de sódio. A urina deve ser semeada, de preferência, em meios seletivos especiais contendo antibióticos, para reduzir a contaminação.

### Tecidos

Devem ser cultivados nos primeiros dias de doença. Coletar assepticamente 1 g de tecido, macerar em aproximadamente 5 mL de solução fisiológica estéril contendo antibiótico (fluoruracila 100 µg/mL ou neomicina 5 a 25 µg/mL). O sobrenadante deve ser inoculado em pequeno volume (0,1 a 1 mL) na diluição próxima de 1:100 com o meio, ou em diluições seriadas, para reduzir os efeitos inibitórios das condições anaeróbicas decorrentes da autólise celular. O meio de cultura deve conter antibióticos (meio de Tween 80/40/lactoalbumina hidrolisado ou EMJH, contendo 0,15% de ágar e 100 a 200 µg/mL de 5-fluoruracila e 0,4 a 1% de soro de coelho). Os tecidos humanos, quando encaminhados para cultura, geralmente são obtidos de necropsias, abortamentos e placentas.

A detecção das leptospiras nas culturas deve ser realizada por meio do emprego de microscopia de campo escuro levando-se em consideração, para a identificação, a morfologia típica das leptospiras e sua motilidade.

### ■ Isolamento em animais de laboratório

Amostras de sangue, LCR, urina e suspensão de tecidos podem ser inoculadas intraperitonealmente em *hamsters*, cobaias e gerbis. As leptospiras podem ser encontradas no fluido peritoneal a partir do 3º dia após a inoculação, às vezes de modo transitório. O fluido peritoneal e o sangue desses animais poderão ser cultivados em meios de cultura. Os animais que sobreviverem à infecção poderão ser portadores das lep-

tospiras em aproximadamente 14 a 28 dias após a inoculação. Esse método é pouco empregado para diagnóstico, sendo mais utilizado no laboratório para a descontaminação de materiais contendo leptospiras. As culturas que ficarão armazenadas por longo período devem ser preservadas em nitrogênio líquido, que, além de possibilitar bons resultados, ainda preserva a virulência da cepa.

As culturas são de grande interesse para confirmação diagnóstica e estudos epidemiológicos e de soroprevalência. Para o médico assistente, que precisa de resposta rápida para instituir a terapêutica, contudo, as culturas pouco auxiliam, pois o crescimento das leptospiras é lento e incerto.

### ■ Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos para a detecção de anticorpos específicos são os mais empregados no diagnóstico laboratorial da leptospirose. Em seguida, são descritos os mais importantes.

#### Teste de microaglutinação

Até o momento é o método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), considerado padrão tanto para detecção de anticorpos específicos encontrados no soro dos infectados, como na identificação das cepas isoladas. Para a identificação de cepas, empregam-se soros imunes produzidos em laboratórios de referência para leptospirose.

No Instituto Adolfo Lutz, laboratório de referência regional para leptospirose, o teste de microaglutinação é realizado de acordo com as normas da OMS. Nesse teste, empregam-se culturas vivas de diferentes sorovares, representantes de diferentes sorogrupos de leptospira, cultivadas em meio EMJH com 6 a 8 dias de crescimento e utilizadas na concentração 0,5 da escala de McFarland. Para cada soro em estudo, são rotineiramente utilizados os seguintes sorovares: *andamana*, *australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *butembo*, *canicola*, *castellonis*, *celledoni*, *copenhageni*, *cynopteri*, *djasiman*, *grippotyphosa*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *panama*, *pomona*, *patoc*, *pyrogenes*, *shermani*, *tarassovi* e *wolffi*.

A leitura da reação é realizada em microscópio de campo escuro equipado com objetiva de longo alcance.

► **Interpretação dos resultados.** Quando na diluição 1:100 do soro, considerada como teste de triagem, verifica-se redução do número de leptospiras livres da ordem de 50% em relação ao controle, este soro é titulado frente a este(s) sorovar(es), realizando-se desta maneira o teste quantitativo. O soro é considerado reagente para um determinado sorovar quando o título é  $\geq 1:100$ . O ponto final do teste quantitativo positivo é dado com a maior diluição do soro em que houve aglutinação de cerca de 50% de leptospiras livres. Na interpretação do resultado da MAT, muitas vezes considera-se como sorovar de *Leptospira* spp. causador da infecção aquele para o qual o soro do paciente apresenta maior título. No entanto, esta não é uma prática adequada porque existe reação cruzada do anticorpo com vários sorovares. Se realizarmos a MAT em amostras de sangue obtidas em diferentes momentos da doença, poderemos constatar alternância dos maiores títulos entre os sorovares empregados na reação.

Para a análise do LCR, são utilizados 50 µL da amostra a 1:1 e igual volume de suspensão antigênica, tornando-se 1:2 na diluição final. Um LCR é considerado reagente quando o título é  $\geq 1:2$ .



O MAT é de execução trabalhosa, utiliza culturas vivas de diferentes sorovares de leptospiros, com risco de infecção acidental da equipe de trabalho; requer manutenção e repiques frequentes das culturas e condições laboratoriais adequadas para essa finalidade. Por ser de execução complexa, a técnica consome muito tempo e a leitura é feita microscopicamente.

Para interpretação dos resultados obtidos no MAT, é sempre aconselhável a coleta de duas amostras de sangue com intervalo médio de 15 dias entre elas. Considera-se o caso comprovado laboratorialmente se houver aumento de título de 4 vezes (soroconversão) entre as duas amostras. Quando o título do soro na segunda amostra permanecer estável sem soroconversão, o caso pode ser considerado presuntivo ou tratar-se de infecção ocorrida no passado.

Os anticorpos detectados pelo MAT podem persistir por longo período com títulos altos como, por exemplo, 1:800. Em áreas endêmicas, como o nosso país, é aconselhável que se observe a soroconversão para confirmação diagnóstica laboratorial, pois anticorpos residuais de infecção ocorrida no passado e não diagnosticada também podem ser detectados por essa técnica. O MAT não apresenta capacidade discriminatória para as diferentes classes de imunoglobulinas.

Em raros casos de leptospirose humana este teste pode não apresentar reatividade, decorrente do fato de que alguns pacientes não produzem anticorpos aglutinantes. As reações cruzadas entre diferentes sorovares são frequentemente observadas no MAT, e os anticorpos aglutinantes começam a surgir tardiamente, no final da segunda semana de doença.

### **Aglutinação macroscópica**

A aglutinação macroscópica (*slide agglutination test* – SAT) utiliza culturas formolizadas como antígeno, na forma de suspensão. A técnica empregada é a de aglutinação em placa ou lâmina. É uma reação de triagem (gênero-específica) e apresenta melhor reatividade com soros coletados na fase aguda da doença. Pode ser de grande utilidade nos pequenos laboratórios e prontos-socorros, possibilitando elucidação rápida da doença. No entanto, é prudente que, nos casos raros que apresentem resultados inconclusivos, os soros sejam encaminhados para os laboratórios de referência e submetidos ao MAT com amostras pareadas. O conjunto de reagentes empregados nesta técnica é produzido pela Fundação Oswaldo Cruz – Bio-Manguinhos, com o nome comercial de Leptoteste-S®, e vem acompanhado das instruções técnicas necessárias para a execução, conservação dos reagentes e interpretação dos resultados. O *kit* é distribuído por órgãos vinculados ao Ministério da Saúde.

### **Fixação de complemento, reação de hemaglutinação, imunofluorescência e contraímuno eletroforese**

São outras técnicas que podem ser empregadas. A técnica de imunofluorescência para a detecção de anticorpos específicos é mais sensível do que o MAT, é capaz de detectar anticorpos nas primeiras semanas de doença, com pico na 4ª semana e declínio no 4º mês. No entanto, pode apresentar reação cruzada com anticorpos encontrados na sífilis e na borreliose.

As técnicas de aglutinação em lâmina e de hemaglutinação indireta foram empregadas como alternativas ao MAT uma vez que, nessas duas técnicas, o antígeno empregado permanece estável, por período maior do que 1 ano, quando armazenado a 4°C. Essas reações são mais sensíveis do que o MAT nos primeiros 10 dias de doença. A técnica de hemaglutinação indireta para leptospirose possibilita detectar anticorpos das classes IgM e IgG, porém é muito trabalhosa, pois, para

a detecção de IgM, requer remoção dos anticorpos IgG por meio de absorção com anticorpos anti-IgG humana. A reação de fixação do complemento emprega como antígeno componentes do envoltório externo da bactéria e é uma reação gênero-específica.

A reação de contraímuno eletroforese apresenta boa sensibilidade, detectando anticorpos antileptospiros mais precocemente do que o MAT.

### **Avanços metodológicos**

No diagnóstico laboratorial da leptospirose, foram introduzidos importantes avanços nos últimos anos empregando-se métodos com melhor sensibilidade e especificidade, bem como menor tempo para a execução dos testes. Isso propicia o aprimoramento do diagnóstico laboratorial e contribui para que o médico assistente tenha mais rapidamente a confirmação diagnóstica do paciente sob os seus cuidados.

### **Pesquisa do agente etiológico nos fluidos biológicos (sangue, LCR e urina)**

A pesquisa das leptospiros nos fluidos biológicos, como sangue, LCR e urina, pode ser feita por meio do teste ELISA de captura e nos tecidos pela *imuno-histoquímica*. Os resultados obtidos com esses métodos ampliam a capacidade de detecção das leptospiros íntegras ou fragmentadas. O agente etiológico é detectado com auxílio de anticorpos específicos, e a reação é revelada pela ação de enzimas como a peroxidase.

### **Reação em cadeia da polimerase**

A PCR (*polymerase chain reaction* – PCR) apresenta grande sensibilidade e tem ampla utilização no diagnóstico laboratorial da doença, é gênero-específica, pois amplifica o DNA de sorovares de leptospiros patogênicos e não patogênicos. A capacidade de discriminar o sorovar, inclusive de cepas em geral não patogênicas, é um aspecto muito importante da PCR, uma vez que, em certas circunstâncias, leptospiros não patogênicos foram isoladas em amostras biológicas de pacientes imunodeprimidos. No entanto, estudos mais bem elaborados precisam ser conduzidos na elucidação desta circunstância. Djadid *et al.* desenvolveram *nested* PCR-RFLP, empregando 16S rRNA, capaz de diferenciar as leptospiros patogênicas das não patogênicas. Kositanont *et al.* desenvolveram, em modelo animal, PCR *multiplex* com *primers* específicos, capazes de amplificar 23S rDNA, com sensibilidade de 98,6% e especificidade de 100%.

A PCR em tempo real tem mostrado bom desempenho no diagnóstico e também no conhecimento da fisiopatogenia da leptospirose. Lourdault *et al.*, em estudos com animais de laboratório, observaram que a bacteriemia foi baixa nos três primeiros dias da infecção, em média  $10^4$  leptospiros/mL, e depois aumentou, alcançando um pico maior que  $10^6$  leptospiros/mL, no quinto dia pós-infecção. Esses autores também observaram que o crescimento das leptospiros em animais de laboratório é exponencial, com tempo de duplicação de aproximadamente 10 h na corrente sanguínea, em comparação ao de 20 h no meio de cultura de EMJH. Segura *et al.* e Truccolo *et al.* empregaram a PCR como ferramenta para estabelecer o prognóstico dos doentes. Esses autores observaram que uma densidade sanguínea  $\geq 10^4$  leptospiros/mL é o limiar crítico para o prognóstico vital dos pacientes. Manu *et al.* empregaram a PCR em tecido humano obtido de necropsia, previamente fixado em formalina, para o estabelecimento de diagnóstico retrospectivo.



Fonseca *et al.* compararam a sensibilidade e a especificidade da PCR empregando dois pares de *primers* diferentes (G1/G2 e LP1/LP2), com os resultados obtidos nas hemoculturas, ELISA-IgM, MAT e SAT, como ferramentas diagnósticas na leptospirose humana. A PCR foi aplicada em sangue e urina, e os demais métodos, apenas em sangue de pacientes com leptospirose, em três momentos distintos da doença, sendo eles: do 3º ao 8º dia de doença, do 9º ao 14º dia e do 15º ao 42º dia. Os resultados de sensibilidade em MAT, ELISA-IgM, SAT e PCR no primeiro momento foram, respectivamente: 69, 79,3, 72,4 e 62%. No segundo momento: 95,4, 100, 100 e 72,7%; no terceiro: 88,9, 88,9, 77,8 e 44,4%. Os autores compararam também a especificidade para a PCR que foi de 100% e para o ELISA-IgM de 89,1%, mostrando que a PCR foi sensível no início da doença, inclusive em amostras de sangue sem a presença de anticorpos específicos e sugerem que a combinação da PCR com os outros testes sorológicos, no início da doença, podem elevar a sensibilidade diagnóstica para 93,1 a 96,5%.

Fonseca *et al.* também mostraram que a amplificação do DNA da *Leptospira* spp., empregando os mesmos pares de *primers*, anteriormente mencionados, possibilita detectar 10 pg de DNA em gel de agarose e 1 pg por hibridização, sem diferença de sensibilidade entre os dois.

Contudo, ainda é preciso maior conhecimento e experiência com este método que necessita alta tecnologia e grande investimento.

### Pesquisa de anticorpos específicos nos fluidos biológicos

As técnicas imunoenzimáticas (ELISA e Dot ELISA) são as mais utilizadas para a pesquisa de anticorpos antileptospira nos fluidos biológicos, como soro, LCR e urina. O teste ELISA é mundialmente empregado e bem-sucedido para o diagnóstico de diferentes patologias humanas. Apresenta altos índices de sensibilidade e especificidade, bem como possibilita a detecção de classes específicas de anticorpos nas diferentes fases da doença.

Na leptospirose humana, o ELISA-IgM tem sido descrito por autores de diversos países como um teste de alta sensibilidade (sensibilidade = 98%) e eficaz para o diagnóstico precoce da doença.

Como referido anteriormente, o MAT, preconizado pela Organização Mundial da Saúde, é uma técnica de execução trabalhosa, empregando, para cada exame, culturas vivas de 22 sorovares que têm de ser mantidas em meios de cultura enriquecidos, o que torna a técnica, além de extremamente trabalhosa, também bastante onerosa. Além disso, o resultado conclusivo é demorado, visto que depende do resultado de uma segunda amostra. Em áreas endêmicas como o nosso país, deverão ser processadas duas amostras de soro do paciente, com intervalo médio de 15 dias para que se observe a soroconversão. Esse conjunto de dificuldades foi determinante para que o *Leptospira* Reference United County Hospital (Inglaterra) passasse a não recomendar o MAT na rotina diagnóstica desde 1988, sugerindo que, para este fim, um método imunoenzimático fosse desenvolvido.

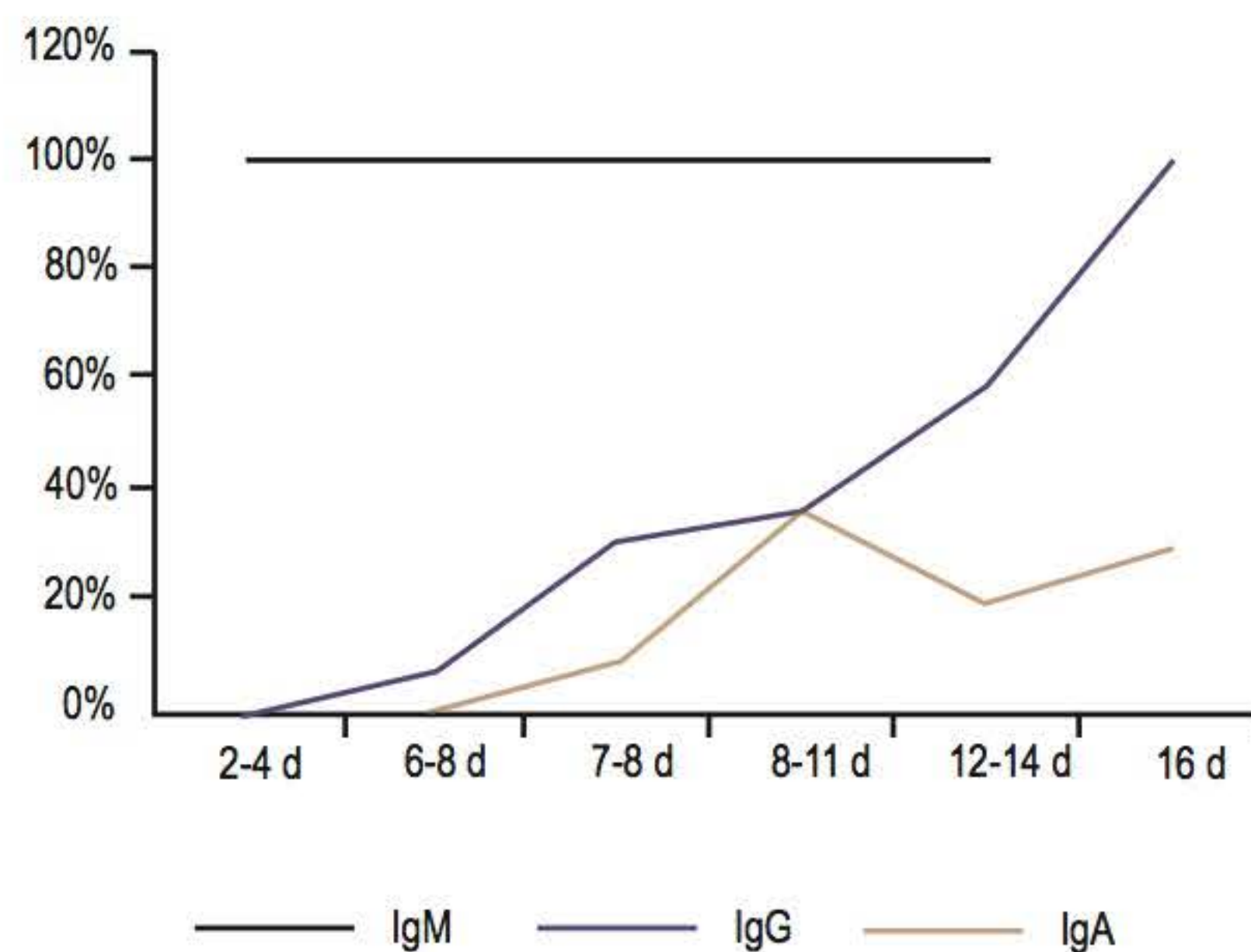
Naquele mesmo ano (1988), a seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz padronizou em nosso meio o método ELISA-IgM, primeiramente utilizando antígeno preparado a partir de culturas de leptospira, cepa Patoc 1 e conjugado enzimático marcado com fosfatase alcalina.

Posteriormente, introduziu-se como antígeno mistura sonificada composta dos sorovares *brasiliensis*, *canicola*, *cynopteri*, *hebdomadis* e *icterohaemorrhagiae*, mais prevalentes no MAT na cidade de São Paulo, e conjugado enzimático marcado com peroxidase.

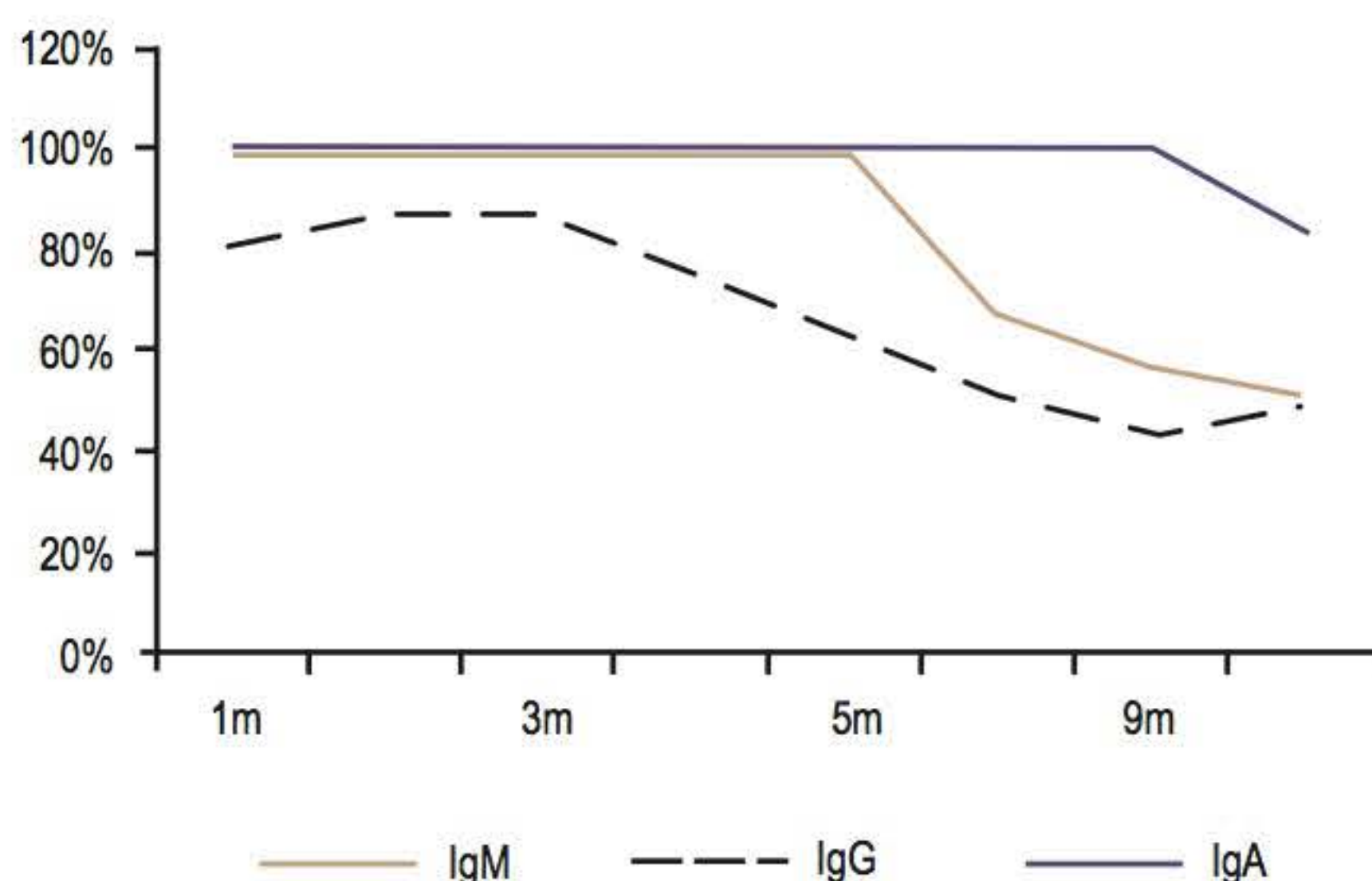
Na fase aguda da doença, a detecção dos anticorpos IgM, pelo método ELISA, em uma única amostra de soro, juntamente com os dados clínicos e epidemiológicos, contribui para um diagnóstico rápido e precoce. O ELISA-IgM também é recomendado no diagnóstico da leptospirose humana pela OMS, pelos laboratórios de referência de Paris e da Holanda.

Com esses testes é possível discriminar anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) dispensando, na maioria das vezes, uma segunda amostra de material biológico para confirmação diagnóstica, distinguindo a infecção recente da pregressa. Os anticorpos específicos da classe IgM, em amostra biológica no início dos sintomas, indica que o paciente está com infecção aguda pela leptospira. A ausência de anticorpo IgM e a presença de IgG e/ou IgA indica infecção pregressa, conforme ilustrado nas Figuras 17.2 e 17.3. Isso mostra que o ELISA pode ser utilizado para diagnóstico de doença e também ser empregado nos estudos soroepidemiológicos com a finalidade de se conhecer infecção pregressa por leptospiros patogênicas em uma determinada população.

Os anticorpos detectados pelo teste ELISA não têm correlação com os detectados por MAT: as duas técnicas avaliam diferentes sistemas antígeno-anticorpo.



**Figura 17.2** Comportamento dos anticorpos específicos das classes IgM, IgG e IgA na leptospirose humana, durante a fase aguda da doença.



**Figura 17.3** Comportamento dos anticorpos específicos das classes IgM, IgG e IgA na leptospirose humana, durante a fase de convalescença da doença.



► **ELISA-IgM para a pesquisa de anticorpos antileptospira na saliva.**

Na busca de melhores alternativas diagnósticas, mais práticas, rápidas, seguras e de menor custo, passou-se a avaliar a utilização da saliva como fluido biológico alternativo ao soro. Nesta técnica, empregam-se amostras de saliva não diluídas (1:1) e conjugado enzimático marcado com fosfatase alcalina.

► **ELISA-IgM para a pesquisa de anticorpos antileptospira no LCR.**

A técnica é executada com 50 µl dos reagentes e as amostras de LCR são empregadas não diluídas (1:1). O conjugado enzimático utilizado é marcado com fosfatase alcalina.

► **Dot ELISA para pesquisa de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA, antileptospira no soro.** O Salivadot é um teste Dot ELISA-IgM para a pesquisa de anticorpos antileptospira na saliva.

O Salivadot emprega na fase sólida tecido de poliéster impregnado com resina de N-metilol-acrilamida e como antígeno a mistura de 5 sorovares de leptospiros, os mesmos empregados no teste ELISA-IgM, ligado covalentemente. A sensibilidade do Salivadot é de 98% e a especificidade de 100%, semelhante à do ELISA-IgM no soro. Este teste detecta anticorpos IgM na saliva já nos primeiros dias da doença. A saliva é coletada diretamente sobre o tecido-resina no qual já foi aplicado previamente o antígeno. Para o processamento do teste dispensam-se equipamentos e estrutura laboratorial, a leitura é visual e o tempo despendido entre a coleta da amostra, o processamento e a leitura é de apenas 1 h, podendo ser aplicado no campo.

O antígeno empregado é obtido de culturas de leptospiros mortas, sem risco de infecção acidental, permitindo armazenamento por longos períodos a -20°C, sem perda de estabilidade. O Salivadot, com ou sem a saliva, pode permanecer em condições ambientes por longo período de tempo sem interferência nos resultados.

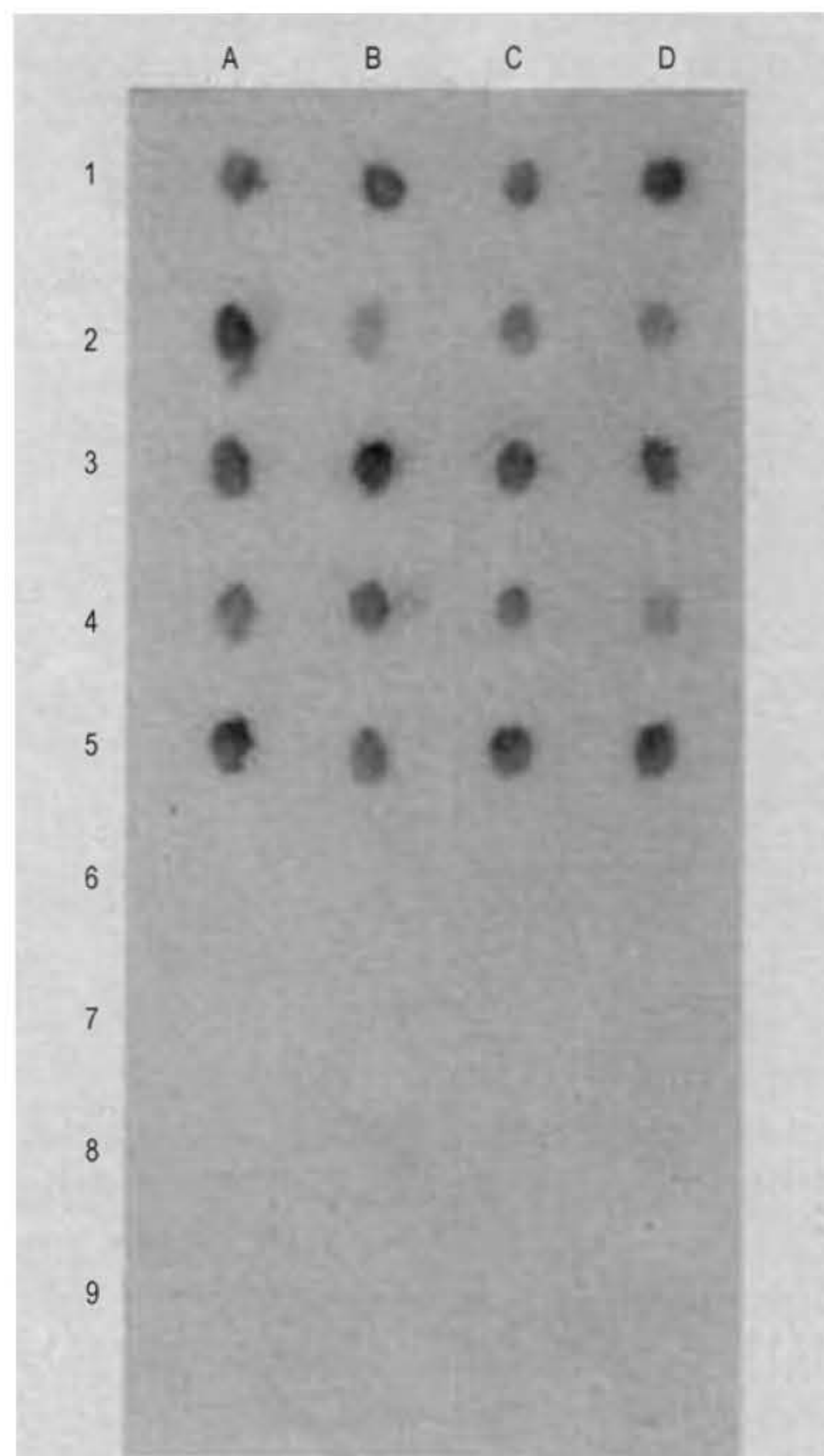
O tecido de poliéster-resina, cuja superfície é tridimensional, oferece grande área disponível para a ligação de proteínas do antígeno. A coleta da saliva é não invasiva, mais segura quando comparada à do sangue e sem risco de acidentes perfurocortantes.

O Salivadot é um método prático, rápido, seguro, de custo reduzido, e requer menor tempo para a coleta e o processamento (Figura 17.4).

Os testes imunoenzimáticos são de boa sensibilidade, especificidade e de reprodução fiel, de execução relativamente fácil e possibilitam redução no tempo de processamento. Fatos como os citados aqui foram relevantes na decisão do Centro Nacional de Referência em Leptospirose do Instituto Pasteur de Paris em indicar o ELISA como teste diagnóstico (gênero-específico), já em 1982. Naquele mesmo ano, também nas orientações normativas da OMS, o ELISA era indicado como importante recurso diagnóstico laboratorial, passando a ser incentivada a sua implantação.

Os testes imunoenzimáticos comparados aos aglutinantes são métodos mais sensíveis e específicos, tornando possível a detecção de anticorpos a partir do 2º ao 4º dia após o início dos sintomas. A execução desses testes é muito mais fácil do que a do MAT, emprega mistura de leptospiros mortas como antígeno, que pode ser armazenado sem perda de estabilidade durante longos períodos a 0°C.

O teste ELISA-IgM para a leptospirose humana começou a ser comercializado empregando como antígeno a mistura de sorovares patogênicos de leptospira. No entanto, é preciso estar atento para que os sorovares empregados como antígeno no teste ELISA sejam os mesmos sorovares prevalentes na região de onde provêm as amostras a serem testadas.



**Figura 17.4** Salivadot para leptospirose humana aplicado em pacientes com a doença e em controles negativos. Linhas 1 a 5: amostras de saliva obtidas de pacientes com leptospirose. Linhas 6 a 9: amostras de saliva controle-negativas. Diluição da saliva 1:1.

Outros métodos foram desenvolvidos para a detecção de imunoglobulinas da classe IgM específicas para a leptospirose, como o Leptodipstick®. A técnica empregada neste teste tem o mesmo princípio do Dot ELISA e também é um teste de rápida e fácil realização. Esse teste não utiliza equipamentos especiais, é passível de ser estocado por longos períodos sem perda da reatividade, mesmo em altas temperaturas. No entanto, apresenta reações cruzadas (falso-positivos) com outras patologias como HIV, hantavirose, toxoplasmose, borreliose de Lyme, malária, meningite meningocócica etc.

Diferentes autores, empregando diferentes processamentos de antígenos, têm obtido resultados de sensibilidade e especificidade distintos nos métodos imunoenzimáticos. Dey *et al.*, desenvolveram antígeno recombinante (r LipL32) empregado no teste ELISA e obtiveram resultados de sensibilidade (96,2%), especificidade (91%) e acurácia (94,1%) comparados aos padrões obtidos no MAT, tornando possível utilizá-lo como teste de triagem diagnóstica na detecção de anticorpos antileptospira.

McBride *et al.* empregaram o teste EIE-IgM-Leptospirose®, produzido por Bio-Manguinhos e distribuído pelo Ministério da Saúde do Brasil, em amostras de soro de pacientes da



cidade de Salvador, Bahia, no período de 1996 a 1999. A sensibilidade do teste foi de 76% nas amostras de soro coletadas na fase aguda da doença (entre o 2º e o 19º dia do início dos sintomas) e de 100% na convalescença (mais que 19 dias do início dos sintomas). A especificidade foi respectivamente de 93 e 100%. No entanto, amostras de sangue coletadas 1 a 2 anos após a hospitalização apresentaram resultado reagente para IgM em 83,3% delas, declinando para 50% em 4 a 5 anos após alta hospitalar. Na Argentina, Vanasco *et al.*, empregando teste ELISA indireto como antígeno em uma mistura das sorovariedades Pyrogenes e Tarassovi, obtiveram sensibilidade de 68,1% nas primeiras amostras (tempo de doença menor que 10 dias), 93,2% nas segundas (entre 10 e 25 dias) e 78,8% nas terceiras (maior que 25 dias), com respectivas especificidades de: 96,3, 99,3 e 100%.

Diante do exposto, com resultados não coincidentes com os obtidos nas amostras pareadas submetidas ao MAT, fica clara a necessidade de outros estudos para a padronização do melhor ou dos melhores testes imunoenzimáticos a serem empregados no diagnóstico da leptospirose humana. Embora o método ELISA seja muito útil, é prudente que, em algumas situações, ele não seja o único empregado no diagnóstico laboratorial da doença.

## ► Bibliografia

- Abrão RV, Silva E. Leptotest-S: diagnóstico da leptospirose por reação única de macroaglutinação em placa (abstr.). In: Anais da IV Jornada Científica da Fundação Oswaldo Cruz. 70 anos do Hospital Evandro Chagas (1921-1991), Rio de Janeiro Brasil, 1991; p. 862-863.
- Adler B, Ballard S, Faine S. EIA test for leptospirosis. *Med J Aust* 1984; 141: 685.
- Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4): 287-296.
- Adler B, Murphy AM, Locarnini SA *et al.* Detection of specific antileptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1980; 11, 5: 452-457.
- Alves VAF, Vianna MR, Yasuda PH *et al.* Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J Pathol* 1987; 151: 125-131.
- Alves VAF, Yashuda PH, Yamashiro EH *et al.* An immunohistochemic assay to localize leptospires in tissue specimens. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1986; 28, 3: 170-173.
- Babudieri B. Animal reservoirs of leptospires. *Ann N Y Acad Sci* 1958; 70: 393-413.
- Baranton G, Postic D. Méthodes de laboratoire leptospirose-borreliose de Lyme. Paris, Institute Pasteur, 1989; 107p. (Collection Commission des Laboratoires de Référence et d'Expertise de l'Institute Pasteur.)
- Blackmore DK, Schollum LM, Moriarty KM. The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *N Z Med J* 1984; 97: 83-86.
- Brandão AP, Camargo ED, Silva ED *et al.* Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3138-42.
- Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de Leptospirose. 2ª ed. rev. Brasília, 1997; 98p.
- Camargo ED, Silva MV, Batista L *et al.* Avaliação do teste ELISA-IgM no diagnóstico precoce da leptospirose humana. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1992; 34: (4): 355-357.
- Camargo ED, Silva MV, Vaz AJ *et al.* ELISA-IgM applied to cerebrospinal fluid in human leptospirosis. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1995; 7(1): 19-22.
- CDC – Center for Diseases Control. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR* 1997; 46 (RR-10), 49.
- Chernuka YG, Shishkina ZS, Baryshev PM *et al.* The dynamics of IgM and IgG antibodies in leptospiral infection in man. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig [A]* 1976; 236: 336-343.
- Dey S, Mohan M, Ramadass P *et al.* Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. *Indian J Med Res* 2008; 128: 172-177.
- Djadid ND, Ganji ZFG, Gouya MM *et al.* A simple and rapid nested polymerase chain-restriction fragment length polymorphism technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 63: 251-256.
- Faine S (ed.). Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva, World Health Organization, 1982 (WHO offset publication n 67).
- Faine S, Adler B, Bolin C *et al.* *Leptospira* and leptospirosis. 2<sup>nd</sup> edition, MediSci, Melbourne, Australia, 1999.
- Fonseca AF, Teixeira MMT, Romero EC *et al.* *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect* 2006; 52: 12-22.
- Fonseca CA, Freitas VLT, Romero EC *et al.* Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop Med Int Health* 2006; 11: 1699-1707.
- Fuentes AMO, Blanco YN. Evaluación de las técnicas de aglutinación en lámina con el antígeno TR y el 2-mercaptoetanol: aplicación en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Bol Soc Venez Microbiol* 1994; 14(2): 6-9.
- Gussenhoven GC, Van Der Hoorn MAWG, Goris MGA *et al.* Leptodipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1997; 35(1): 92-97.
- Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A *et al.* Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. By multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 117-122.
- Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1): 11-14.
- Lourdault K, Aviat F, Picardeau M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2009; 58: 648-655.
- Mailloux M, Dufresne Y. Le diagnostic immunologique des leptospiroses: comparaison de la technique ELISA à la réaction d'agglutination-lyse. *Bull Acad Nat Med* 1985; 169(3): 363-367.
- Mailloux M, Dufresne Y, Mazzonelli J *et al.* Intérêt de la méthode ELISA dans le diagnostic des leptospiroses. *Med Mal Infect* 1984; 14(3): 107-109.
- Manu V, Roy S, Duttaroy AR *et al.* PCR on formalin-fixed necropsy tissues to diagnose leptospirosis. *Indian J Med Res* 2009; 129: 105-107.
- McBride AJA, Pereira FA, Silva ED *et al.* Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop* 2007; 102: 206-211.
- Mérien F, Amouriaux P, Baranton G *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30(9): 2219-2224.
- Raoult D, Hechemy KE, Baranton G. Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27(10): 2152-2155.
- Ribeiro MA, Cavalcante ZMO, Lopes DM *et al.* Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no imunodiagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1985; 45: 37-42.
- Ribeiro MA, Godano A, Kawarabayashi M *et al.* Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1984; 44(1): 35-40.
- Ribeiro MA, Kawarabayashi M, Yamada LK *et al.* Imunodiagnóstico da leptospirose humana. Estudo comparativo das reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1981; 41(2): 135-143.
- Romero EC, Caly CR, Yasuda PH. The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by microscopic agglutination test. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1998; 40(3): 183-184.
- Santa Rosa CA. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev Microbiol* 1970; 1(2): 97-109.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K *et al.* Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 343-351.
- Silva MV. Salivadot. Novo método para o diagnóstico precoce da leptospirose humana. São Paulo, 1998. 177p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Silva MV, Camargo ED. Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgA na leptospirose humana. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1992; 34(3): 239-242.
- Silva MV, Camargo ED, Batista L *et al.* Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. *J Top Med Hyg* 1995; 98: 268-272.
- Silva MV, Camargo ED, Vaz AJ *et al.* Immunodiagnosis of human leptospirosis using saliva. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 560-561.



- Silva MV, Camargo ED, Vaz AJ *et al.* Imunodiagnóstico da leptospirose humana através do teste ELISA-IgM, empregando-se diferentes preparações antigênicas a partir de sorotipos prevalentes de *Leptospira interrogans*. Rev Inst Med Trop S Paulo 1990; 32(4): 233-239.
- Silva MV, Camargo ED, Vaz AJ *et al.* Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgM na leptospirose humana. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 30(2): 95-100.
- Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED *et al.* Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 650-655.
- Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED *et al.* Dot-ELISA-IgM in saliva for the diagnosis of human leptospirosis using polyester fabric-resin as support (preliminary report). Rev Inst Med Trop S Paulo 1994; 36(5): 475-478.
- Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzymelinked-immunosorbent assay (ELISA). Zbl Bakt Hyg I Abt Orig [A] 1980; 247: 400-405.
- Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. J Gene Microbiol 1985; 131: 377-385.
- Truccolo J, Serais O, Merien F *et al.* Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. FEMS Microbiol Lett 2001; 204: 317-321.
- Uip DE. Diagnóstico precoce da leptospirose por biopsia de músculo da panturrilha (resumo de tese). Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23(3): 185.
- Vanasco NB, Lottersberger J, Schmeling MF *et al.* Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. Rev Panam Salud Publica 2007; 21: 388-395.
- Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 1997; 10: 357-361.
- Yasuda PH, Sakata EE, Shikanai-Yasuda MA *et al.* Avaliação da contraimuno-eletroforese com antígenos dos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *patoc* no diagnóstico sorológico da leptospirose humana. Rev Inst Med Trop S Paulo 1991; 33(6): 497-502.



## Capítulo 18

---

# Meningites Bacterianas Agudas

*Luís dos Ramos Machado*

- Introdução, 228
- Diagnóstico, 229
- Tratamento, 230
- Diagnóstico diferencial, 232
- Evolução, 232
- Bibliografia, 233



## ► Introdução

Meningites bacterianas agudas (MBA) são infecções graves e, habitualmente, provocam mortalidade e morbidade elevadas. O diagnóstico deve ser feito com rapidez, e o tratamento, instituído precocemente. Disso depende, em grande parte, o prognóstico do paciente.

Por definição, meningites são processos infecciosos que acometem as meninges e o espaço contido entre essas membranas. Neste espaço (espaço subaracnóideo) está contido o líquido cefalorraquidiano (LCR).

O LCR envolve o cérebro e a medula, preenche as cisternas da base do crânio e envolve nervos cranianos e quiasma óptico. O espaço subaracnóideo é, portanto, um compartimento contínuo; sobrepujadas as defesas naturais, um agente infeccioso espalha-se rapidamente por todo esse espaço. O processo inflamatório das meningites não costuma acometer o espaço subdural, a não ser ocasionalmente, sobretudo em crianças, dando origem às coleções subdurais. Consequentemente, as meningites podem causar cerebrites ou meningoencefalites, dependendo da agressividade do agente etiológico (principalmente pneumococos) e do grau de inflamação associado.

Classicamente, as meningites bacterianas agudas são causadas por três agentes principais (pneumococos, meningococos e hemófilos) e, mais raramente, por estreptococos do grupo B e por *Listeria*. São fatos relacionados com a doença:

- As meningites por hemófilos e, em menor grau, por pneumococos diminuíram acentuadamente nos últimos anos em razão da vacinação em massa contra essas bactérias no mundo ocidental
- Em epidemias, traumas cranioencefálicos, intervenções neurocirúrgicas e situações de imunodepressão, pode haver outros agentes etiológicos envolvidos
- A mortalidade da meningite por meningococos e por hemófilos varia de 5 a 15%. As sequelas ocorrem em cerca de 10%
- Nas meningites por pneumococos, a mortalidade é de 15 a 30%. Dos que sobrevivem, 30% podem apresentar sequelas
- Os dados de morbimortalidade em meningites por estreptococos do grupo B e por *Listeria* variam muito na literatura, por causa das situações clínicas de imunodepressão associadas.

## ■ Aspectos etiopatogênicos

Na maioria das vezes as bactérias precisam causar septicemia prévia, geralmente com modificações no endotélio vascular, antes de alcançar o sistema nervoso. Esse quadro sistêmico pode provocar:

- Migração seletiva de leucócitos, com predomínio absoluto de neutrófilos e sem passagem de hemácias
- Quebra da barreira hematoencefálica, tornando possível a passagem de água e eletrólitos, albumina, complemento e anticorpos de baixa especificidade
- Formação de exsudato inflamatório, seroso nas meninges da convexidade e fibroso na base do crânio. O exsudato fibroso pode ocasionar bloqueios do fluxo normal de LCR, causando hidrocefalia e/ou aracnoidites
- Instalação de edema vasogênico, que resulta em edema cerebral de intensidade variável, seja pela bacteriemia ou pela concentração aumentada de óxido nítrico no LCR que ocorre nas meningites bacterianas
- Tromboflebitas, que podem surgir habitualmente depois da primeira semana, embora também possam ocorrer nos primeiros dias.

Na maioria dos casos, a hipertensão intracraniana é de tipo comunicante, e não há sinais de localização. A hipertensão deve-se preponderantemente ao acúmulo de LCR, sem evidência de aumento de produção. Admite-se que a hipertensão se instale por dificuldades nos mecanismos de reabsorção, causadas pelo processo inflamatório. Edema cerebral, quando ocorre, costuma ser pouco expressivo, a não ser em fases terminais. Não havendo componente parenquimatoso importante, não há riscos para a indicação do exame de LCR, essencial para o diagnóstico.

Nos pacientes mais graves, pode haver hipertensão intracraniana com papiledema, sinais de lesão focal, crises convulsivas, acometimento de estruturas do tronco encefálico. Nesses casos, mais raros, o prognóstico é reservado e o manejo clínico, muito mais difícil.

## ■ Quadro clínico

O quadro clínico das meningites é composto por três síndromes principais, apresentadas a seguir.

► **Síndrome de hipertensão intracraniana (SHIC).** Cefaleia intensa, náuseas, vômitos e confusão mental. Habitualmente, os vômitos são precedidos por náuseas. A ocorrência clássica de vômitos em jato é observada apenas esporadicamente. Em geral, não há papiledema nesta fase, em razão do caráter agudo de instalação da SHIC.

► **Síndrome toxêmica.** Sinais gerais de toxemia, incluindo febre alta, *delirium* e mal-estar. É frequente o achado de dissociação entre pulso (que se altera pouco) e de temperatura (que alcança níveis elevados).

► **Síndrome de irritação meníngea.** São sinais da síndrome:

- **Rigidez de nuca:** com o paciente em decúbito horizontal, é feita flexão anterior da cabeça. O paciente apresenta graus variáveis de dificuldade na execução da prova, sendo a espasticidade muscular de natureza reflexa
- **Sinal de Brudzinski:** ao se fazer a pesquisa do sinal de rigidez de nuca, o examinador deve observar também os joelhos do paciente, que precisam ser mantidos descobertos. Ao se proceder à flexão anterior da cabeça, o paciente flete ligeiramente ambos os joelhos
- **Sinal de Kernig:** o doente deve estar em decúbito dorsal. Uma das coxas é fletida sobre o abdome, em ângulo de cerca de 90°, e a perna do mesmo lado, fletida em relação à coxa também aproximadamente a 90°. A perna é então estendida passivamente, com uma das mãos do examinador sob o calcanhar da perna fletida, empurrando para cima, e a outra mão sobre o joelho da mesma perna, empurrando para baixo, de modo a haver um estiramento do membro inferior até cerca de 45°. Quando há inflamação meníngea, o paciente resiste à extensão da perna; o modo mediante o qual se pesquisa este sinal e a sua interpretação são diferentes da descrição original. Na manobra originalmente descrita por Kernig, o médico tentava, passivamente, fazer a extensão do joelho do paciente que estava na posição sentada; em pacientes com meningite, havia resistência a essa manobra de extensão, caracterizando um estado de “contratura das extremidades”
- **Sinal de desconforto lombar:** em decúbito dorsal, o paciente deve fletir um dos joelhos; em seguida, é solicitado a empurrar vigorosamente a mão do examinador, que, apoiada na região plantar do paciente e no plano do leito, opõe resistência ao movimento. O sinal é positivo quando o paciente se queixa de desconforto (algo semelhante a uma sensação parestésica) na região lombar ao fazer a extensão forçada da perna.



As três síndromes são encontradas, concomitantemente, em cerca de 44% dos pacientes, mais frequentemente em casos de meningite por pneumococos (58%) do que naquelas por meningococos (27%). Duas das três síndromes são encontradas em 95% dos casos, sugerindo fortemente o diagnóstico de meningite aguda.

No momento da admissão, pode haver outras infecções relacionadas com a meningite, como otites, sinusites e pneumonias, mais frequentemente em doentes com meningite pneumocócica. *Rash* cutâneo, mais frequente em doença meningocócica, pode ser encontrado também em doentes com meningites por pneumococos, hemófilos e, mais raramente, por enterovírus. Sintomas gastrintestinais podem ocorrer em quase 25% dos casos de meningite por *Listeria*.

Em crianças, sobretudo nas mais novas, o diagnóstico é mais difícil. Não há queixa de cefaleia, e os sinais de irritação meníngea podem estar ausentes ou ser mais difíceis de reconhecer. Os achados mais frequentes são: febre, irritabilidade, prostração, vômitos, convulsões e, eventualmente, abaulamento de fontanela. Rigidez na nuca bem como sinais de Kernig e Brudzinski são observados em cerca de 50% das crianças com meningite. É consenso que os pediatras devem suspeitar sistematicamente da doença e indicar a punção para coleta de LCR com determinada liberalidade.

## ► Diagnóstico

A confirmação diagnóstica das meningites bacterianas é estabelecida por exames complementares.

O exame auxiliar imprescindível é o exame de LCR. O diagnóstico é sindrômico (aumento do número de células, predomínio absoluto de neutrófilos, hiperproteinorraquia, hipoglicorraquia intensa), muitas vezes completado pelo diagnóstico etiológico (presença do agente etiológico ao exame bacteriológico direto ou detecção de antígenos bacterianos pela prova do

látex). Os riscos do exame de LCR, desde que não haja sinais de localização (comprometimento parenquimatoso), são praticamente nulos. As principais alterações do exame de LCR nas meningites bacterianas, em comparação com o que ocorre nas meningites virais, estão listadas no Quadro 18.1.

O fator tempo é crucial no tratamento das MBA, e os exames de imagem podem causar atraso na conduta clínica, sem acrescentar elementos relevantes ao diagnóstico; por isso, os exames de neuroimagem têm pouquíssimo valor na fase de diagnóstico das meningites bacterianas agudas, e não precisam nem devem ser solicitados rotineiramente, a não ser nas situações em que eles tenham precedência, descritas a seguir:

- Quando há sinais de localização ao exame neurológico
- Quando, clinicamente, a síndrome toxêmica for pouco expressiva ou inexistente
- Quando há deterioração precoce do estado clínico
- Quando há papiledema ao exame físico: papiledema costuma surgir após 36 a 48 h de vigência de hipertensão intracraniana; seu aparecimento em quadros agudos com poucas horas de evolução sugere fortemente haver outro tipo de etiologia (processo expansivo *sensu lato*) que esteja ocorrendo de modo associado ou concomitante.

Durante a evolução, exames de neuroimagem são imprescindíveis quando houver sinais clínicos de complicações das meningites bacterianas agudas: ventriculites, coleções epidurais infectadas ou, mais raramente, abscessos cerebrais.

Exames laboratoriais de rotina em processos infecciosos agudos também devem ser solicitados no caso de MBA. Deve-se enfatizar especialmente as hemoculturas seriadas, uma vez que o agente etiológico chega ao sistema nervoso, na maioria das vezes, por via hematogênica. Além disso, em até 30% dos casos de MBA, bactérias podem entrar na corrente circulatória a partir de focos infecciosos meníngeos, mesmo quando não detectadas ao exame de LCR.

**Quadro 18.1 • Exame do LCR em meningites agudas do sistema nervoso.**

	Bacterianas	Virais
Número de células	Elevado (95%); mais frequente: 100 a 2.000	Elevado (100%); mais frequente: 10 a 500
Linfócitos/monócitos	Raros na fase inicial; aumentam na evolução favorável	Predomínio absoluto (> 60% do perfil)
Neutrófilos	Geralmente superior a 90% do perfil; persistem assim por > 48 h	Eventuais na fase aguda; enterovírus: até 95% do perfil; desaparecem em < 48 h
Plasmócitos	Não costumam aparecer; presentes nas formas crônicas	Frequentes
Macrófagos	Sem pigmento hemossiderótico	Sem pigmento hemossiderótico
Proteínas totais	Elevadas (95%); valor mais frequente: 80 a 1.000 mg	Na fase inicial: normais; na fase de recuperação: até 80 a 100 mg
Glicose	Muito baixa (99%); varia com a glicemia	Normal; eventualmente diminuída em HSV-2; varia com a glicemia
Lactato	Muito elevado (99%); não varia com a glicemia	Normal; eventualmente elevado em HSV-2; não varia com a glicemia
ADA	Normal na fase aguda; elevada: sofrimento do encéfalo	Normal
Globulinas gama	Aumento não tem significado; não há imunoprodução local	Normal; não há imunoprodução local
Antígenos (exame direto)	Antes de antibióticos: 40 a 90%; depois de antibióticos: < 40%	Ausentes
Antígenos (látex)	Meningo: sens. 33 a 70%; espec. 100% Pneumo: sens. 69 a 100%; espec. 96% Hemófilos: sens. 78 a 86%; espec. 100% Estrepto B: sens. 79%; espec. 100%	Ausentes
Culturas	70 a 85% positivas em até 48 h	Negativas
Sequências DNA	Não disponíveis	Disponíveis para enterovírus: sens. 97%; espec. 100%; muito pouco usados na prática (baixa relação custo/benefício)
Anticorpos	Ausentes	Pesquisa obrigatória em meningites de repetição: HSV-2 (sens. e espec. > 90%); comparar com níveis séricos



## ► Tratamento

As meningites bacterianas devem ser encaradas como emergências médicas. Muitas vezes, é necessário iniciar o tratamento antes de se conhecer o agente etiológico. Os esquemas usuais, as indicações e as doses constam dos Quadros 18.2 a 18.7.

Nos casos mais graves, quando houver petéquias, choque ou sinais de edema cerebral intenso logo à admissão, é necessário tomar medidas de emergência:

- Hidratação cuidadosa e imediata
- Administração de ceftriaxona em bolo, logo após o acesso venoso
- Aplicação de vancomicina em infusão venosa lenta, por 1 h
- Manitol, se houver evidência de edema cerebral.

## ▪ Corticosteroides

O uso sistemático de corticosteroides no tratamento das MBA tem sido preconizado na literatura especializada. A maioria dos autores sugere sua utilização entre 15 e 30 min antes da primeira dose ou, no máximo, acompanhando a primeira dose de antibióticos.

Utiliza-se, em adultos, dexametasona na dose de 10 mg a cada 6 h durante 4 dias. Em crianças, a dose diária de dexametasona é de 0,4 a 0,6 mg/kg em 4 vezes, também durante 4 dias.

O fundamento teórico para a utilização de corticosteroides nas MBA é a sua ação rápida e eficaz na modulação negativa da atividade dos mediadores inflamatórios, que ocasionam agressão significativa ao tecido cerebral paralelamente à defesa contra a infecção. Essa atividade inflamatória ocorre ao se iniciar o tratamento com antimicrobianos, provocando liberação maciça de antígenos bacterianos e de suas toxinas.

**Quadro 18.2 - Tratamento empírico das meningites bacterianas agudas.**

Idade	Agentes mais prováveis	Esquema de escolha	Esquema alternativo	Comentários
< 3 meses	Estrepto B, <i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> , pneumococos, <i>H. influenzae</i>	Ampicilina + ceftriaxona (ou cefotaxima)	Cloranfenicol + gentamicina	Níveis baixos podem ocorrer no LCR de RN de baixo peso. Tobramicina ou ampicilina no lugar da gentamicina quando houver enterobactérias resistentes à gentamicina
3 meses a 17 anos	Meningococos, pneumococos, <i>H. influenzae</i>	Ceftriaxona (ou cefotaxima)	Meropeném ou cloranfenicol	Acrescentar vancomicina em áreas com > 2% de pneumococos altamente resistentes
18 a 50 anos	Pneumococos, meningococos, <i>H. influenzae</i>	Ceftriaxona (ou cefotaxima)	Meropeném ou cloranfenicol	Acrescentar vancomicina em áreas com > 2% de pneumococos altamente resistentes
> 50 anos	Pneumococos, <i>Listeria</i> , bacilos gram-negativos	Ampicilina + ceftriaxona (ou cefotaxima)	Ampicilina + fluoroquinolona (ciprofloxacino, levofloxacino ou trovafloxacino)	Acrescentar vancomicina em áreas com > 2% de pneumococos altamente resistentes; para tratar <i>Listeria</i> em pacientes alérgicos à penicilina, usar sulfametoxazol-trimetoprima

Adaptado de Spach e Jackson.

**Quadro 18.3 - Tratamento empírico das meningites bacterianas agudas em situações particulares.**

Situação	Agentes mais prováveis	Esquema de escolha	Esquema alternativo
Comprometimento da imunidade celular	<i>Listeria</i> , bacilos gram-negativos, <i>S. aureus</i>	Ampicilina + ceftazidima + vancomicina	Sulfametoxazol-trimetoprima + meropeném
Fraturas da base do crânio ou fístulas de LCR	Pneumococos, vários estreptococos, <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i>	Cefotaxima (ou ceftazidima) + vancomicina	Vancomicina + cloranfenicol (ou meropeném)
Derivações de trânsito de LCR	<i>S. aureus</i> , estafilococos coagulase-negativos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , enterobactérias	Vancomicina + ceftazidima	Meropeném + vancomicina

**Quadro 18.4 - Tratamento específico das meningites bacterianas agudas.**

Agente etiológico	Esquema de escolha	Esquema alternativo	Duração do tratamento
Estrepto B	Penicilina G (ou ampicilina)	Vancomicina	14 a 21 dias
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ceftriaxona (ou cefotaxima)	Cloranfenicol	7 a 10 dias
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ampicilina + gentamicina	Sulfametoxazol-trimetoprima; linezolida	14 a 21 dias
<i>Neisseria meningitidis</i>	Penicilina G (ou ampicilina)	Ceftriaxona (ou cefotaxima); cloranfenicol	7 a 10 dias
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (conc. inib. mín. < 0,1)	Ceftriaxona (ou cefotaxima)	Penicilina G; meropeném	10 a 14 dias
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (conc. inib. mín. ≥ 0,1)	Vancomicina + ceftriaxona (ou cefotaxima)	Trocar a vancomicina por rifampicina; em pacientes alérgicos a cefalosporinas, usar a vancomicina isoladamente	10 a 14 dias

Adaptado de Spach e Jackson.



**Quadro 18.5 - Tratamento específico das meningites bacterianas agudas adquiridas em ambiente hospitalar.**

Agente etiológico	Esquema de escolha	Esquema alternativo	Injeção intratecal associada
<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à meticilina	Nafcilina ou oxacilina (associada ou não a rifampicina)	Vancomicina	—
<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina	Vancomicina (associada ou não a rifampicina)	Linezolida ou sulfametoxazol-trimetoprima + rifampicina	Vancomicina, 5 a 20 mg/dia, sem conservantes (0,5 mg/kg em crianças) Apenas quando não houver boa resposta a partir de tratamento sistêmico
<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>	Vancomicina (associada ou não a rifampicina)	Linezolida	Vancomicina, se necessário, 5 a 20 mg/dia (0,5 mg/kg em crianças)
Enterobactérias	Cefotaxima ou ceftriaxona	Meropeném; aztreonam; sulfametoxazol-trimetoprima	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cefotazidima + tobramicina (ou gentamicina)	Meropeném; aztreonam; piperacilina + tobramicina (ou gentamicina)	Gentamicina, se necessário, 2 a 4 mg/dia (1 a 2 mg em crianças)
<i>Streptococcus agalactiae</i> ( <i>Streptococcus</i> do grupo B)	Ampicilina ou penicilina G	Cefotaxima ou ceftriaxona; vancomicina	—
<i>Enterococcus</i> sp.	Ampicilina (ou penicilina G) + gentamicina	Vancomicina + gentamicina; linezolida + gentamicina	Gentamicina, se necessário, 2 a 4 mg/dia (1 a 2 mg em crianças)

**Quadro 18.6 - Doses intravenosas recomendadas para o tratamento das meningites bacterianas agudas adquiridas na comunidade.**

Antimicrobiano	Crianças	Adultos
Ampicilina	75 mg/kg a cada 6 h	2 g a cada 4 h
Cefotaxima	50 a 75 mg/kg a cada 6 h	2 g a cada 6 h
Ceftriaxona	50 a 75 mg/kg a cada 12 h	2 g a cada 12 h
Ceftazidima	75 mg/kg a cada 12 h	2 g a cada 8 h
Cloranfenicol	25 mg/kg a cada 6 h	1 g a cada 6 h
Gentamicina	2,5 mg/kg a cada 8 h (monitorar nível sérico)	2 mg/kg (dose de ataque); em seguida: 1,7 mg/kg a cada 8 h (monitorar nível sérico)
Levofloxacino	Não indicado para crianças	0,5 g a cada 24 h
Meropeném	40 mg/kg a cada 8 h	1 g a cada 8 h
Penicilina G	50.000 U/kg a cada 4 h	4,0 milhões U a cada 4 h
Rifampicina	10 mg/kg a cada 24 h (máximo: 600 mg/dia)	600 mg a cada 24 h
Sulfametoxazol-trimetoprima	10 mg (trimetoprima)/kg a cada 12 h	10 mg (trimetoprima)/kg a cada 12 h
Vancomicina	15 mg/kg a cada 6 h (máximo: 2,0 g/dia)	1 g a cada 12 h

Adaptado de Spach e Jackson.

**Quadro 18.7 - Doses intravenosas recomendadas para o tratamento das meningites bacterianas agudas em ambiente hospitalar.**

Antimicrobiano	Dose diária em adultos (com funções hepática e renal normais)	Observações
Amicacina	5 mg/kg a cada 8 h	Monitorar nível sérico
Ampicilina	2 g a cada 4 h	—
Aztreonam	1,5 a 2,0 mg a cada 6 h	—
Cefotaxima	2 g a cada 6 h	—
Ceftriaxona	2 g a cada 12 h	—
Ceftazidima	2 g a cada 8 h	—
Ciprofloxacino	400 mg a cada 8 h	—
Cloranfenicol	1 g a cada 6 h	Monitorar nível sérico
Gentamicina	2 mg/kg (dose de ataque); a seguir: 1,7 mg/kg a cada 8 h	Monitorar nível sérico
Levofloxacino	0,5 g a cada 24 h	—
Linezolida	600 mg a cada 12 h	—
Meropeném	2 g a cada 8 h	Pode induzir crises convulsivas
Nafcilina	1,5 a 2,0 g a cada 4 h	—
Oxacilina	1,5 a 2,0 g a cada 4 h	—
Penicilina G	4 milhões U a cada 4 h	—
Piperacilina	4 g a cada 4 h	—
Rifampicina	600 mg a cada 24 h	—
Tobramicina	1 a 1,5 mg/kg a cada 8 h	Monitorar nível sérico
Sulfametoxazol-trimetoprima	10 mg (trimetoprima)/kg a cada 12 h	—
Vancomicina	1 g a cada 12 h	Monitorar nível sérico



Os benefícios que advêm do uso de corticosteroides são: diminuição da mortalidade, redução nas alterações da audição e diminuição das sequelas neurológicas. Entretanto, à custa de poder implicar pior prognóstico, a utilização de corticosteroides não deve ser realizada quando houver:

- Insegurança diagnóstica
- Uso anterior recente de antimicrobianos intravenosos
- Hipersensibilidade a corticosteroides
- Trauma cranioencefálico recente
- Instalação prévia de sistema de derivação do trânsito do LCR
- MBA hospitalar.

## ▪ Profilaxia

A quimioprofilaxia dos contactantes é importante em meningites por hemófilos e por meningococos. Deve ser feita o mais precocemente possível, de preferência nas primeiras 24 h; entretanto, continua sendo necessária mesmo mais tardiamente (até o 30º dia pós-contato).

Para quimioprofilaxia, deve ser utilizado um dos seguintes esquemas terapêuticos:

- Rifampicina 600 mg/dia, por via oral, ministrada de 12 em 12 h por 2 dias
- Ceftriaxona 250 mg, por via intramuscular, em dose única
- Ciprofloxacino 500 mg, por via oral, em dose única
- Azitromicina, 500 mg, por via oral, em dose única.

O antimicrobiano mais utilizado atualmente com esta finalidade é o ciprofloxacino.

## Indicação

A profilaxia está indicada a:

- Pessoas que morem no mesmo domicílio no qual tenha ocorrido um caso de meningite ou que compartilhem o mesmo alojamento em domicílios coletivos (quartéis, orfanatos, internatos e outros)
- Colegas de berçários, creches ou pré-escolas (geralmente crianças menores de 7 anos), bem como adultos dessas instituições que tenham mantido contato com crianças acometidas por meningite
- Pessoas que tenham tido relação íntima e prolongada com o doente e que tenham tido contato com as secreções orais
- Profissionais de saúde que tenham sido expostos às secreções do paciente sem as medidas de proteção adequadas, sobretudo antes ou no início da antibioticoterapia.

## ► Diagnóstico diferencial

Os diagnósticos diferenciais mais importantes das MBA são:

- Meningites virais em sua fase inicial, sobretudo aquelas provocadas por enterovírus
- Abscessos com liberação de material infectado
- Meningoencefalites por tuberculose e fungos, especialmente nos episódios agudos ou de reagudização
- Focos bacterianos parameningeais
- Meningismo, seja por hemácias ou por injeção de substâncias no espaço subaracnóideo com finalidade terapêutica ou diagnóstica.

Embora se trate realmente de MBA, o diagnóstico é mais difícil nas seguintes situações:

- Em fases muito precoces das MBA, quando não há ainda um exame de LCR definido
- Em infecções bacterianas incompletas ou inadequadamente tratadas
- Em rombencefalites por *Listeria*
- Quando a carga bacteriana for baixa ou a virulência da cepa for menor
- Quando houver imunodeficiência específica.

## ► Evolução

Os pacientes com MBA tratados de modo adequado costumam apresentar sinais de melhora em pouco tempo:

- Nas primeiras 4 a 6 h deve haver melhora significativa do quadro de confusão mental
- Entre 6 e 12 h a febre costuma diminuir
- Os sinais de irritação meníngea melhoram mais tardiamente, geralmente depois de alguns dias.

Em geral, as meningites da comunidade por meningococos sem complicações têm condições de alta após 7 dias, desde que o paciente se mantenha afebril por 5 dias. O mesmo vale para os doentes com MBA por hemófilos. Pacientes com pneumococos devem permanecer internados por períodos maiores, de 10 a 14 dias, se não houver complicações.

## ▪ Segundo exame de LCR

Classicamente, o segundo exame de LCR deve ser feito cerca de 72 h após o primeiro. Nessa oportunidade, o clínico pode avaliar a evolução do processo inflamatório do liquor em comparação à evolução clínica. O número de células deve sofrer queda significativa; os valores percentuais de neutrófilos devem mostrar tendência de queda; as taxas de glicose, embora ainda baixas, devem exibir níveis significativamente mais elevados; não devem ser encontradas bactérias ou, ao menos, deve ter havido redução expressiva à bacterioscopia direta. Nessa ocasião, devem estar disponíveis os resultados das culturas e antibiograma do primeiro exame, o que facilita eventuais ajustes ou modificações no esquema terapêutico.

Nas MBA por meningococos e hemófilos, quando o quadro clínico apresentar melhora muito expressiva e os sinais infecciosos regredirem quase por completo em 3 ou 4 dias, pode ser dispensada a realização desse segundo exame e até mesmo do exame de alta.

Entretanto, o exame de LCR de controle é obrigatório:

- Quando não houver melhora significativa nas primeiras 48 h de tratamento. A nova amostra de LCR destina-se à pesquisa de bactérias viáveis. Esta intercorrência pode se dar em função de penetração inadequada do antimicrobiano através das barreiras ou de recuperação parcial da função dessas barreiras devido ao uso associado de dexametasona
- Ao término do tratamento de MBA por pneumococos. Nestes casos, pode haver reativação do foco primário ou resistência relativa aos antimicrobianos utilizados, nem sempre passível de detecção pelos métodos laboratoriais rotineiros.

Em situações particulares, outros exames de LCR poderão ser feitos semanalmente, dependendo da evolução clínica e laboratorial do paciente.



## ■ Complicações das MBA

As complicações precoces mais frequentes das MBA são: edema cerebral, sobretudo em crianças; coagulação intravascular disseminada; endocardite, miocardite ou pericardite; hiponatremia; convulsões; sinais de localização; endoftalmite; trombose de carótida.

Algumas dessas complicações, em que não há manifestações clínicas evidentes, podem ser suspeitadas quando:

- A melhora clínica inicial não se confirmar nos períodos seguintes
- O paciente apresentar piora do nível de consciência
- O exame de LCR exibir evolução mais lenta do que o esperado ou aparecem sinais de reagudização do processo.

Nestas eventualidades, impõe-se a utilização de recursos de neuroimagem, dependendo da gravidade do quadro e dos recursos disponíveis:

- Tomografia computadorizada do crânio
- Ultrassonografia, sobretudo em recém-nascidos e em crianças antes do fechamento da fontanela bregmática
- Ressonância magnética
- Angiografia cerebral.

As principais complicações tardias são: déficit auditivo; coleção subdural; empiema subdural; ventriculite; hidrocefalia; encefalite com retardamento mental; alterações cerebrovasculares, como hemorragia, trombose ou infarto; abscesso (raramente).

Considerando-se o conjunto das MBA:

- A mortalidade varia de 15 a 20%
- Estado vegetativo, em 10 a 15%
- Disfunção grave, em 3 a 5%
- Disfunção moderada, em 14 a 20%
- Disfunção leve ou nula, em 66%.

Alterações cognitivas podem ser detectadas em cerca de 10% dos pacientes que foram acometidos por MBA.

## ■ Meningites recorrentes

Embora raramente, as MBA podem recorrer, mais frequentemente em meningites por pneumococos (1/3 dos casos). Isso pode acontecer quando houver: deficiência imunológica; alterações anatômicas: fraturas da base do crânio; lesões erosivas da mastoide; defeitos congênitos de estruturas dérmicas ao longo do neuroeixo; lesões perfurantes do crânio; procedimentos neurocirúrgicos; fístulas ocultas ou que surgem de modo intermitente, por vezes meses ou anos após trauma cranioencefálico.

O diagnóstico de alterações anatômicas deve ser feito por exames de neuroimagem. O diagnóstico de fístulas pode ser feito por: uso de radioisótopos, em exames de medicina nuclear; TC frontal e da mastoide com protocolos específicos; pesquisa de glicose em níveis significativos nas secreções nasal ou auricular.

O tratamento das MBA recorrentes não difere daquele utilizado para as MBA clássicas.

## ► Bibliografia

- Braden C. Listeriosis. *Ped Infec Dis J* 2003; 22(8):745-746.
- Cabeça HL, Gomes HR, Machado LR *et al.* Dosage of lactate in the cerebrospinal fluid in infectious diseases of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59:843-848.
- Cabellos C, Verdaguer R, Olmo M *et al.* Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: experience over 30 years. *Medicine* 2009; 88(2):115-119.
- Coyle PK. Overview of acute and chronic meningitis. *Neurol Clin* 1999; 4:691-710.
- Davis LE, Kennedy PGE. Infectious diseases of the nervous system. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000.
- Dubos F, Martinot A, Gendrel BG *et al.* Clinical decision rules for evaluating meningitis in children. *Curr Op Neurol* 2009; 22(3):288-293.
- Fishman RA. Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system. Philadelphia: WB Saunders Company, 1980.
- Green GB, Harris IS, Lin GA *et al.* Central Nervous System Infections. Washington Manual of Medical Therapeutics. 31st ed. Lippincott, 2004.
- Halperin JJ. Bacterial infections. In: Mohr JP, Gautier JC. Guide to clinical neurology. New York: Churchill Livingstone, 1995, p. 629-637.
- Hussein AS, Shafran SD. Acute bacterial meningitis in adults: a 12-year review. *Medicine* 2000; 76:360-368.
- Leung A. Lumbar punctures for suspected meningitis in adults. *Infec Dis Clin Pract* 2008; 16(5):273-275.
- Livramento JA, Machado LR, Spina-frança A. Líquido cefalorraquidiano. In: Nitrini R, Bacheschi LA. A Neurologia que todo médico deve saber. 2 ed. São Paulo: Atheneu 2003; 85-87.
- Machado LR, Gomes HR. Processos infecciosos do sistema nervoso. In: Nitrini R, Bacheschi LA. A Neurologia que todo médico deve saber. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003; p. 205-234.
- Machado LR, Livramento JA, Nóbrega JPS *et al.* Neuroinfecção-98. São Paulo: Clínica Neurológica, FMUSP, 1998.
- Marra C. CSF: techniques and complications. 55<sup>th</sup> Annual Meeting American Academy of Neurology. *Syllabi*. On CD ROM 2003.
- Marra CM. Central nervous system infections. *Neurologic Clinics*. Philadelphia: Saunders, 1999.
- Mazzoni P, Pearson TS, Rowland LP. Bacterial infections and aseptic meningitis. *Merritt's neurology handbook*. 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott, 2006.
- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184:101-122.
- Scheld WM, Withley RJ, Durack DT. Infections of the nervous system. 2 ed. New York: Raven, 1996.
- Scott LA, Tintinalli JE, Brewer KL *et al.* Lumbar punctures for suspected meningitis in adults. *Infect Dis Clin Pract* 2008; 16(5):298-302.
- Seltz LB, Cohen E, Weinstein M. Risk of bacterial or herpes simplex virus meningitis/encephalitis in children with complex febrile seizures. *Ped Emerg Care* 2009; 25(8):494-497.
- Shakir RA, Newman PK, Poser CM. Tropical neurology. London: Saunders, 1996.
- Spach DH, Jackson LA. Bacterial meningitis. *Neurologic Clinics* 17(4): 711-735, 1999.
- Spina-França A, Livramento JA, Machado LR. Líquido cefalorraquidiano. In: Porto CC. Semiologia médica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2001; p. 1194-1199.
- Tunkel AR, Scheld WM. Corticosteroids for everyone with meningitis? *N Engl J Med* 2002; 347(20):1613-1615.
- Van de Beek D, de Gans J, McIntire P *et al.* Adjuvant corticosteroid therapy reduces death, hearing loss, and neurologic sequelae in bacterial meningitis. *ACP Journal Club* 2004; 140:34-36.
- Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L *et al.* Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351(18):1849-1859.
- Van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR *et al.* Current concepts: community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 2006; 354(1):44-53.
- WHO. Meningococcal meningitis. *Ind J Med Sci* 2003; 57:369-372.
- Zoons E, Weisfelt M, de Gans JP. Seizures in adults with bacterial meningitis. *Neurology* 2008; 70:2109-2115.
- Zunt JR, Marra CM. Cerebrospinal fluid testing for the diagnosis of central nervous system infection. *Neurol Clin* 1999; 4:675-690.



## Capítulo 19

---

# Sífilis

*Mário Endsfieldz Camargo e  
Thelma Suely Okay*

- Introdução, 235
- Diagnóstico laboratorial, 235
- Utilização e interpretação dos testes para sífilis, 237
- Referências bibliográficas, 240



## ► Introdução

Doença infecciosa causada por uma espiroqueta, o *Treponema pallidum*, subespécie *pallidum*, a sífilis apresenta índices de incidência que voltaram a crescer após uma década de estabilização, como observado para as demais doenças sexualmente transmissíveis. Para isso, contribuíram não somente o comportamento sexual, como também a disseminação do uso de heroína, maco-nha, metadona, e, em especial, a cocaína/*crack*, levando à prostituição por essas substâncias. Nesse período, o índice de gestantes que usavam *crack* sofreu crescimento de mais de 20 vezes, com consequente aumento da incidência de sífilis congênita, avaliada nos EUA em mais de 2 casos por 10.000 nascidos vivos, além de ser responsável por cerca de 40% dos óbitos perinatais resultantes da infecção intrauterina.<sup>1-4</sup>

No Brasil, os índices de prevalência da sífilis mostram ascensão evidente, com cerca de 1 milhão de novos casos de sífilis registrados a cada ano, sendo aproximadamente 29.000 os casos de sífilis congênita, e, destes, apenas 5.749 foram notificados no ano de 2006, de acordo com estimativa do Ministério da Saúde (Programa Nacional de DST/AIDS). Desde 1993, o Ministério da Saúde propôs um projeto de eliminação da sífilis congênita (SC) enquanto um problema de saúde pública, em consonância com a proposta de controle do agravo nas Américas formulada pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização Pan-Americana de Saúde, definindo como meta uma incidência menor ou igual a 1 caso/1.000 nascidos vivos. Os resultados deste programa indicam que houve mais sucesso na prevenção da transmissão vertical do HIV que da sífilis congênita. Estima-se que, no país, a média da prevalência da sífilis na gestação varie de 3,5 a 4%; e o índice de mortalidade por sífilis congênita no Brasil, de 70 a 100 por milhão de nascidos vivos.<sup>5,6</sup>

Após o contágio sexual, o protossifiloma, lesão primária no local de inoculação, surge cerca de 10 dias a 3 meses depois, em geral entre 3 e 4 semanas, como ulceração indolor, de bordas endurecidas e reação ganglionar satélite. A lesão tende a desaparecer espontaneamente após 4 a 6 semanas, seguindo-se a fase de secundarismo. Essa fase se manifesta cerca de 1 a 6 meses após o desaparecimento do protossifiloma, como processo infeccioso com roséolas, lesões mucosas e linfadenopatia generalizada, por vezes reação meníngea, que também cedem espontaneamente após período de 2 a 6 semanas. Ao secundarismo, segue-se a fase de sífilis recente latente, nos primeiros anos após a infecção, quando pode haver recorrências de lesões cutâneas e mucosas, oculares e, ocasionalmente, a neurosífilis recente. A fase de secundarismo se apresenta como meningite aguda, não raro com alterações em nervos cranianos ou acidentes vasculares cerebrais. Raramente encontrada em casos insuficientemente tratados de indivíduos com sistema imunológico funcionando, é observada em infectados pelo HIV, mesmo quando tratados da infecção sífilítica recente segundo esquemas terapêuticos considerados eficientes.<sup>7</sup> Segue-se a fase latente tardia que, 5 a 20 anos após a infecção, pode dar lugar à sífilis terciária, sintomática, com lesões destrutivas, cardiovasculares ou do sistema nervoso central, com demência, psicose, *tabes dorsalis*, ou com o surgimento de lesões gomosas em pele, ossos e vísceras.

## ► Diagnóstico laboratorial

Em razão da ausência de manifestações clínicas, ou, quando há, proteiformes, o diagnóstico da sífilis baseia-se na evidência do *Treponema* nas lesões ou, mais frequentemente, na detecção de anticorpos suscitados pela infecção.

### ■ Pesquisa de treponema

O treponema pode ser evidenciado na sífilis recente, no material de protossifiloma ou de lesões cutâneas ou mucosas do secundarismo e da sífilis congênita, por observação microscópica direta, em campo escuro, ou após coloração pela prata, pelos corantes de Leishman ou Giemsa, ou por imunofluorescência.

#### *Pesquisa em campo escuro*

É essencial a coleta adequada do material, no protossifiloma, removendo-se a camada de material que recobre a lesão, delicadamente, com uma gaze para que não sangre e, em seguida, tocando-se a superfície da ulceração com a lâmina de microscopia para coletar a gota de exsudato límpido que lá se forma. Sob lâmina, esta é examinada em seguida por microscopia de campo escuro, com objetiva de 40 a 100× de aumento. Juntando-se as bordas da lâmina, por exemplo, com esmalte de unhas, para que o material não seque, este pode ser examinado mesmo após 1 ou 2 h. O treponema pode ser pesquisado em raspado de lesão cutânea ou mucosa, ou no aspirado de punção de nódulo linfático satélite à lesão primária. A adequação da centragem e da altura do condensador de campo escuro, para perfeita luminosidade, deve ser previamente comprovada por exame de material que habitualmente contém espirilos, como treponemas bucais de raspado de gengivas. À observação direta, a fresco, o *Treponema pallidum* é delgado, com 6 a 8 espiras regulares e apertadas, movimentando-se ativamente para diante e para trás por rotação contínua.

#### *Pesquisa após coloração*

Seco e fixado ao calor brando, o material pode ser corado pela prata (Fontana) ou, discretamente, por corante pan-óptico como o Giemsa. Especialmente para material de lesões mucosas da boca, que podem apresentar treponemas não patogênicos morfológicamente semelhantes, é preferível a coloração por imunofluorescência. Pela técnica direta, a lâmina é incubada com anticorpo conjugado a fluoresceína, monoclonal ou policlonal, específico para *T. pallidum*. Na falta deste, pode-se proceder à técnica indireta, utilizando-se um soro reagente, de alto título, de paciente com sífilis. Tornado específico para o *T. pallidum* por diluição no reagente absorvente (*sorbent* utilizado no teste FTA-Abs), este soro é incubado sobre o preparado a examinar, que, em seguida, depois de lavado, é incubado com conjugado fluorescente antiglobulinas humanas. A coloração por imunofluorescência, ou por técnica imuno-histoquímica realizada com anticorpo marcado com enzima, também pode evidenciar o treponema em cortes de tecido.

#### *Teste de infectividade em coelho e pesquisa de DNA*

De soro ou do LCR, o *T. pallidum* pode ser isolado por inoculação em testículo de coelho.<sup>8,9</sup> O treponema também pode ser evidenciado pela identificação de segmento específico de DNA, extraído de tecidos, inclusive fixados em parafina, muito embora os tecidos parafinados resultem, em porcentagem significativa de casos, em amostras de DNA que não se



prestam à amplificação. A literatura relata tentativas realizadas com amostras de soro e outros materiais biológicos, tais como os fluidos oculares e o cefalorraquidiano, amplificados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). Diversos sistemas de amplificação, tanto convencionais como os realizados em tempo real (*real-time PCR*) têm sido propostos, muitos dos quais usando como alvo o gene que codifica a proteína de membrana de 47 kDa do *T. pallidum*, tanto na sífilis primária quanto na secundária e na forma latente, apresentando resultados ainda heterogêneos, mais promissores em lesões sifilíticas primárias do que em sangue, soro, plasma, fluidos oculares ou líquido cefalorraquidiano. Sendo assim, ao menos até que existam técnicas moleculares comercialmente disponíveis e previamente validadas, as ferramentas moleculares devem ser analisadas em conjunto com os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais oriundos de testes treponêmicos e não treponêmicos. A PCR também tem sido proposta como ferramenta para subtipar os treponemas, e ainda para a detecção de cepas resistentes a macrolídeos e outros fármacos.<sup>10-17</sup>

## ■ Testes sorológicos

Distinguem-se em *testes lipoídicos ou de cardiolipina* e *testes treponêmicos*, de acordo com os reagentes antigênicos empregados.

### Testes de cardiolipina

Os testes de cardiolipina utilizam como antígeno esse fosfolípido, princípio ativo dos extratos de coração de boi, empregados há mais de 80 anos para a pesquisa das “reaginas”, anticorpos que, embora habitualmente encontrados no soro em quantidades diminutas, na sífilis atingem altos níveis. Presente em numerosos tecidos orgânicos, a cardiolipina é de especificidade limitada; porém, a alta sensibilidade, a pronta resposta à terapêutica, o custo reduzido e a simplicidade de execução dos testes lipoídicos asseguram-lhes uso generalizado na sorologia da sífilis. Simples reação de floculação, o teste cardiolipínico do VDRL (*veneral disease research laboratory*) e suas variantes, como o teste RPR (*rapid plasma reagin*) e o Carbotest, vieram substituir as técnicas de fixação do complemento (Wasserman, Kolmer, Maltaner), atualmente em desuso. Basicamente, consistem em suspensões de cristais de colesterol como suporte da cardiolipina, em meio aquoso contendo lecitina, que são aglutinados em presença do soro reagente. De alta sensibilidade, porém sujeitos a resultados falso-positivos, assim como a resultados falso-negativos, especialmente na sífilis tardia, os testes de cardiolipina devem ter seus resultados confirmados pelos testes treponêmicos. Os testes de cardiolipina qualitativos são realizados com soro puro (1/1), e também sempre com soro diluído (1/10), pelo risco de resultado falso-negativo eventualmente observado nos soros fortemente reagentes não diluídos, por fenômeno de pré-zona. Para os testes quantitativos, são ensaiadas diluições dobradas, a partir de 1/1. A sensibilidade e a especificidade dos testes de cardiolipina, especialmente do VDRL, podem variar acentuadamente se não forem rigorosamente obedecidos os mínimos detalhes de técnica, a experiência mostrando que, entre nós, os resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos, têm sido frequentes, como evidenciado por Jorge<sup>18</sup> e por nossas próprias observações. É absolutamente necessária, para todos os laboratórios que realizam esses testes, a manutenção de um rigoroso e constante controle de qualidade, interno e externo.

### Testes treponêmicos

Os testes sorológicos são realizados com *Treponema pallidum*, ou com seus antígenos, obtidos a partir de testículos de coelhos infectados. O primeiro teste descrito, de *imobilização do treponema*<sup>19</sup> deu lugar, pela maior facilidade de execução, ao teste de imunofluorescência (FTA-Abs, de *fluorescent treponemal antibody-absorption*),<sup>20</sup> realizado após absorção ou bloqueio de anticorpos não específicos eventualmente encontrados no soro. Procede-se a essa absorção diluindo-se o soro a 1/5 no reagente absorvente (*sorbent*), que é um decocto de cultura, em meio rico em peptídios e soro animal, de *Treponema phagedenis* biotipo *Reiter*, não patogênico. O soro é então incubado sobre *T. pallidum* fixados em lâmina de microscopia, seguindo-se lavagens e incubação com conjugado fluorescente anti-imunoglobulinas humanas. A fluorescência dos treponemas indica *soro reagente* quando de 2, 3 ou 4+, atribuindo-se *reatividade limiar* quando de 1+, e *não reatividade* quando ausente ou duvidosa a coloração fluorescente. A recomendação atual é que os testes dados como duvidosos (*borderlines*) sejam considerados como não reagentes. Os testes duvidosos ou de reatividade limiar devem ser repetidos para confirmação.<sup>21</sup> A subjetividade da leitura microscópica e as variações de sensibilidade do teste exigem, além de rigorosa padronização, a inclusão sistemática em cada reação, de soros testemunhas, reagente, não reagente e principalmente, de reatividade limiar, para avaliação segura de cada resultado observado (este último pode ser obtido no Laboratório de Doenças Transmissíveis dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças – CDC, Atlanta, EUA). É sempre imprescindível certificar-se da presença de treponemas no preparado, por inspeção em campo escuro ou pela utilização da técnica de dupla coloração.<sup>22</sup> Nesta, o conjugado anti-IgG é marcado pela rodamina, corando os treponemas em vermelho nas reações positivas, fazendo-se uma contracoloração com anticorpo antitreponema, marcado pela fluoresceína, que os cora em verde nos testes negativos. São numerosas e frequentes as causas de resultados insatisfatórios, em razão da baixa luminosidade de objetivas, filtros deteriorados, fonte luminosa enfraquecida, antígenos com baixa reatividade, conjugados de qualidade inferior ou erroneamente diluídos, subjetividade da leitura microscópica etc.

No teste FTA-Abs-IgM, para a pesquisa de anticorpos IgM, utiliza-se conjugado fluorescente específico anti-IgM (anti- $\mu$ ). O alto risco de resultados falso-positivos, por interferência de fatores reumatoides eventualmente encontrados no soro, e de resultados falso-negativos, pela competição de anticorpos IgG, torna obrigatória a remoção prévia das IgG das amostras de soro a testar, por exemplo por precipitação com soro anti-IgG.<sup>23</sup> Do mesmo modo, pode-se fracionar previamente o soro, separando-se a fração IgM de 19S e realizando-se o teste FTA-Abs 19S IgM com esta mesma fração.<sup>24</sup>

Comparável ao teste FTA-Abs quanto aos resultados, o teste de *micro-hemaglutinação* com hemácias recobertas com antígenos de *T. pallidum* é de execução mais simples, e a sua leitura visual não exige equipamentos.<sup>25,26</sup> A padronização dos reagentes pelos fabricantes assegura ao teste a adequada padronização. Atualmente, utilizam-se hemácias nucleadas, de aves, que, pela rápida sedimentação, possibilitam resultados após 1 h de reação, e que não são sensíveis à interferência de anticorpos heterófilos. O teste é realizado em microplacas plásticas, adicionando-se a suspensão das hemácias reagentes às diluições do soro feitas no reagente absorvente. Nos testes reagentes, as hemácias depositam-se como um tapete no fundo da cavidade, ou como botão nos testes não reagentes.



Os testes imunoenzimáticos (ELISA ou EIA) são processados com extratos antigênicos de *T. pallidum* fixados sobre suportes, como microesferas ou cavidades de placas plásticas. Sobre estes, incubam-se, sucessivamente, diluições do soro absorvente, de conjugado enzimático anti-IgG humanas, e, por fim, a mistura cromógena, todas estas incubações intercaladas por lavagens da placa, lendo-se, então, em espectrofotômetro a coloração resultante. Uma intensidade limiar de coloração, predeterminada segundo as colorações obtidas para soros de não sífilíticos, torna possível identificar os soros reagentes, que originam absorbâncias acima desse valor. Seis antígenos recombinantes de *T. pallidum* foram testados por técnica imunoenzimática para determinação das sensibilidades e especificidades de cada um deles em 43 amostras de pacientes com sífilis, 8 com febre recorrente, 8 com doença de Lyme, 9 com leptospirose e 15 indivíduos não infectados. Três dos antígenos recombinantes (Tp0155, Tp0483 e Tp0751) apresentaram sensibilidades baixas, variando entre 28 e 42%, enquanto os outros três apresentaram desempenho satisfatório: Tp0453, 100% de sensibilidade e 100% de especificidade; Tp92 (Tp0326), 98% de sensibilidade e 97% de especificidade e Gpd (Tp0257), 91% de sensibilidade e 93% de especificidade. Tanto o Tp0453 quanto o Tp92 e o Gpd foram igualmente capazes de reconhecer soros de pacientes com sífilis primária precoce que não haviam sido detectados pelo VDRL. A reatividade dos soros de pacientes com Tp0453, Tp92 e Gpd foi proporcional aos títulos obtidos com o teste de microaglutinação (MHA-TP). Sendo assim, o estudo concluiu que os antígenos recombinantes Tp0453, Tp92 e Gpd se mostraram promissores marcadores de diagnóstico quando usados em testes imunoenzimáticos.<sup>27</sup> Outro antígeno recombinante, rTp47, foi identificado por meio de técnica de *Western blot* em 100 pacientes brasileiros com sífilis confirmada pelo uso do VDRL, TPHA e FTA-Abs. Estes mesmos 100 soros foram testados por técnica de ELISA-rTp47 e, apesar de 90 terem sido positivos, 10 foram negativos, muito embora tenham apresentado reatividade contra outras frações antigênicas do *T. pallidum* (Tp17 e Tp15), demonstrando a necessidade de se agregarem várias frações antigênicas em um mesmo teste imunoenzimático com o intuito de melhorar a sensibilidade do teste.<sup>28</sup>

Há estreita correlação entre os resultados dos testes treponêmicos, ELISA e FTA-Abs, embora não sejam totalmente superponíveis. Desta maneira, o diagnóstico sorológico da sífilis deve ter base em uma combinação de resultados de testes treponêmicos e não treponêmicos.

Para a detecção de anticorpos IgM, emprega-se ELISA com conjugado anti- $\mu$ , mas deve-se remover previamente as IgG da amostra a analisar, como para o teste FTA-Abs-IgM. Preferencialmente, utiliza-se o teste de captura de IgM, incubando-se o soro sobre o suporte recoberto com anticorpo anti-IgM. “Captura-se”, então, uma amostra das IgM do soro sobre a placa. Nova incubação com antígeno de *T. pallidum*, marcado com enzima, seguida de desenvolvimento de cor pela ação desta sobre reagentes cromógenos então adicionados, torna possível identificar anticorpos IgM antitreponêmicos.

Especialmente para o diagnóstico da sífilis congênita, tem sido indicada a pesquisa de anticorpos IgM pelo teste de *immunoblot* IgM, principalmente com frações lipoproteicas do *T. pallidum* obtidas por partição, com Triton X-114, de extratos do treponema.<sup>29</sup> Depois de separadas por cromatografia em bandas paralelas, essas frações são transferidas para folhas de nitrocelulose, que são cortadas em tiras, perpendicularmente às bandas. O soro é incubado sobre a tira de nitrocelulose, e sua reação com as diferentes frações antigênicas é revelada

incubando-se a tira com conjugado enzimático anti-IgM, seguida de desenvolvimento de cor.

Em estudo recente,<sup>30</sup> duas técnicas de *immunoblot* foram comparadas (INNO-LIA Syphilis Score ou LIA e o MarDx *T. pallidum* IgG Marblot Test –TWB), utilizando como referências um EIA (ELISA), TPPA e FTA-Abs para o diagnóstico de sífilis no Laboratório de Saúde Pública de Hong Kong. Foram testados 135 pacientes: 39 com sífilis primária, 20 com sífilis secundária, 18 com sífilis latente precoce e 58 com sífilis latente, além de 43 indivíduos saudáveis. As diferenças entre o LIA e os testes convencionais (EIA/TPPA, FTA-Abs) não foram significativas, porém a sensibilidade do TWB foi mais baixa. A sensibilidade do teste LIA foi de 94,1%, e do TWB de 65,2%. Ambos os testes apresentaram 100% de especificidade. Os autores concluíram que o LIA pode representar uma alternativa válida como teste confirmatório para o diagnóstico de sífilis.

## ► Utilização e interpretação dos testes para sífilis

Na sífilis primária, os testes de cardiolipina e treponêmicos positivam depois do aparecimento, mas ainda na vigência do protossífiloma, com sensibilidade maior para o FTA-Abs e para o VDRL (85%) do que para o teste de hemaglutinação (60 a 70%), porém menor para o teste de imobilização (40%). No secundarismo e na sífilis latente recente, a sensibilidade dos diversos testes é de 99 a 100%, porém, na sífilis tardia, decresce para 70% para os testes de cardiolipina, mantendo-se elevada (98%) para os testes treponêmicos.

Quanto à especificidade, os testes de cardiolipina, quando aplicados a uma população considerada normal, como de doadores de sangue, apresentam 1% ou menos de resultados falso-positivos, mas estes podem alcançar porcentagens mais elevadas em idosos, gestantes, viciados em drogas ilícitas e diferentes grupos de pacientes, como aqueles com autoanticorpos ou portadores de doenças do tecido conjuntivo, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide etc., com níveis de até 40% de resultados falso-positivos. De causas outras que não a sífilis, estas reações falso-positivas biológicas em geral mostram títulos baixos, de 1/1 a 1/4, mas eventualmente elevados. Podem ser agudas, de duração transitória, frequentes após vacinações ou em infecções bacterianas, virais ou parasitárias, como na pneumonia por micoplasma, na malária, ocasionalmente na gravidez etc. As crônicas, que por definição persistem por mais de 6 meses ou são permanentes, são encontradas em casos de doenças do colágeno, lúpus, tiroidites, hanseníase, viciados em substâncias ilícitas, idosos, ou podem ser idiopáticas, sem causa aparente.

Característica importante dos testes de cardiolipina é que possibilitam acompanhar a terapêutica, pela rápida resposta representada pela queda de títulos e mesmo pela negativação (sororreversão), modificações mais lentas e mesmo inexistentes para os testes treponêmicos.

Os testes treponêmicos apresentam especificidade de 96 a 99% e não máxima (100%), como muitas vezes foi apregoadado. Assim, não devem ser utilizados para triagem, pois, em populações de baixa prevalência da sífilis, uma alta proporção dos positivos seria de resultados falsos. Deste modo, ao se submeterem a testes treponêmicos, pessoas oriundas de uma determinada população, por exemplo, com 1 a 2% de prevalência de sífilis, a esta porcentagem de testes verdadeiro-positivos somar-se-iam



cerca de 1 a 4% de resultados falso-positivos, correspondentes aos níveis de inespecificidade do teste. Isso significaria de um terço a metade de falso-positivos, ou seja, um baixo valor preditivo positivo para o teste. Observação importante é que os testes treponêmicos com antígenos de *T. pallidum* são positivos também em outras infecções treponêmicas, como a pinta ou caratê e a boubá ou piã, assim como na sífilis endêmica.

Deste modo, os testes treponêmicos devem ser reservados para confirmação dos resultados dos testes de cardiolipina, quando então assumem elevado valor diagnóstico. Suponhamos pacientes hospitalares com 2% de prevalência de sífilis, ou seja, com 200 casos em 10.000 pessoas submetidas a exames sorológicos para a sífilis. Utilizando um teste treponêmico, seriam encontrados 200 resultados verdadeiro-positivos e mais outros 200 falso-positivos, esses devidos aos 2% de inespecificidade do teste observados nessa população, o que nos daria apenas metade de verdadeiro-positivos (valor preditivo positivo de 50%). Para um teste de cardiolipina, seriam encontrados, na triagem, 200 verdadeiro-positivos, mas não seria surpresa uma inespecificidade de 10%, resultando mais 800 falso-positivos. O valor preditivo positivo seria de apenas 20% (200 verdadeiros no total de 1.000 positivos). Entretanto, submetendo-se estes 1.000 soros reagentes pela cardiolipina ao teste treponêmico como teste confirmatório, seriam encontrados 200 resultados verdadeiro-positivos correspondentes aos sífilíticos, mas apenas 16 falso-positivos, do que resulta um valor preditivo positivo de 93%. As porcentagens de positividade para as diferentes intensidades de fluorescência, nos vários estágios da sífilis, estão assinaladas no Quadro 19.1, cujos dados mostram a alta especificidade do teste FTA-Abs quando a intensidade da fluorescência é de 3 ou 4+, enquanto limitada para as reações fracas, especialmente quando de reatividade limiar, de 1+.

Justifica-se a utilização de testes treponêmicos quando os testes de cardiolipina são negativos, nas circunstâncias em que a sensibilidade destes é baixa, como para a confirmação de sífilis terciária e, eventualmente, na sífilis primária.

### ■ Testes sorológicos na avaliação do tratamento

No seguimento terapêutico da sífilis os testes quantitativos de cardiolipina são indispensáveis, pois seus títulos tendem a declinar ou negativar-se após tratamento eficaz (sororreversão). O mesmo não ocorre com os testes treponêmicos, que tendem a se manter inalterados por longo período.

Na sífilis recente o tempo para negatificação dos testes de cardiolipina, após tratamento eficaz, é tanto mais demorado quanto maior a duração da infecção, ou quanto mais elevados

forem os títulos no início do tratamento. Na sífilis primária ou secundária, os títulos declinam de modo exponencial, em geral, cerca de 4 vezes ao fim dos primeiros 3 meses, e de 8 vezes ao fim de 6 meses, negativando-se em cerca de 1 ano para a sífilis primária tratada, e em 2 anos para a secundária.

A necessidade de novo tratamento, em consequência de terapêutica ineficaz ou de reinfecção, é indicada por elevação duradoura do título de pelo menos 4 vezes, ou pela persistência de título elevado, por exemplo, de 1/8, por 1 ano após o tratamento. Nas formas tardias, a terapêutica antilúética pode resultar em queda lenta de títulos dos testes de cardiolipina, que, na maioria das vezes, permanecem persistentemente em títulos baixos.

Quanto aos testes treponêmicos, na sífilis recente tratada, podem ser negativados em alguns anos, o que não é observado após o tratamento da sífilis tardia. Entretanto, os testes treponêmicos para anticorpos IgM seriam positivos somente na sífilis em atividade, tendendo à negatificação após terapêutica eficaz.<sup>31-39</sup>

### ■ Neurosífilis

O *Treponema pallidum* pode ocasionar lesões do sistema nervoso central, observadas principalmente na sífilis tardia como forma terciária da infecção, após longo período de latência e atingindo principalmente estruturas ectodérmicas, de que resultam psicoses, demência, *tabes dorsalis*. Como já observado por Ehrlich, ao tratamento inadequado da sífilis recente pode seguir-se, a curto prazo, de 6 meses a 1 ano, o aparecimento de neurosífilis recente, a que ele denominou “neurorecorrência”. A “neurorecorrência” acomete principalmente tecidos de origem mesodérmica, causando lesões de nervos cranianos, acidentes vasculares cerebrais e meningites agudas. A neurosífilis recente é observada em pacientes infectados pelo HIV, pela frequente concomitância das duas infecções. Ainda que tratados da infecção treponêmica nas fases de sífilis recente com doses de penicilina G benzatina consideradas curativas, cerca de 50% desses pacientes apresentam lesões neurológicas, que podem ocorrer mesmo antes de qualquer manifestação da AIDS e com níveis de CD4 acima de 200/mm<sup>3</sup>.<sup>5</sup> A hipótese é de que realmente a penicilina por si só não seja capaz de erradicar o treponema, sendo indispensável a ação do sistema imunológico para a cura clínica, confirmando as várias referências da permanência do treponema após tratamento, em linfonodos ou no humor aquoso, e que justificaria a “cicatriz sorológica”, positividade permanente da sorologia na sífilis tratada e clinicamente curada.<sup>40,41</sup>

**Quadro 19.1 - Porcentagens de reatividade do teste FTA-Abs em pacientes (tratados e não tratados) com teste de cardiolipina reagente, em diferentes fases da sífilis e em não sífilíticos.**

Reatividade	Sífilis							
	Primária		Secundária		Latente		Terciária	Não sífilis (%)
	NT (%)	T (%)	NT (%)	T (%)	NT (%)	T (%)	NT (%)	
Não reagente	7,6	9,1	0	0	0	2,2	3,3	96,4
Limiar 1+	9,4	5,2	2,6	2	4,4	2,2	8,3	2,3
2+	13,2	5,2	0	4	5,2	2,9	6,7	0,9
3+	7,5	14,3	6,4	10,1	13	14	26,7	0,4
4+	62,3	66,2	91	83,9	77,2	78,7	55	0
Total reagentes 2+ a 4+	83	85,7	97,4	98	95,6	95,6	88,4	1,3

NT = não tratados; T = tratados. Modificado de Larsen *et al.*, incluindo-se os casos *borderline* como não reagentes e aqueles 1+ reagentes, como de reatividade limiar.<sup>21</sup>



### Diagnóstico laboratorial e acompanhamento terapêutico da neurosífilis

A produção intratecal de anticorpos anti-*Treponema pallidum* é uma evidência de neurosífilis e traduz-se pela positividade do teste do VDRL no líquido cefalorraquidiano em cerca de 50% dos casos (de até 90% na neurosífilis sintomática, mas de apenas 10% quando não sintomática), porém com especificidade de 99,8% para esse diagnóstico. Os testes treponêmicos no líquido cefalorraquidiano também são positivos, mas o teste FTA-Abs mostra-se igualmente reagente nas demais apresentações da sífilis sem comprometimento neurológico. Entretanto, no teste de hemaglutinação com antígenos de *T. pallidum*, os títulos líquidos são em geral de 1/8 ou mais na neurosífilis, enquanto de até 1/4 nas demais formas da sífilis.<sup>26</sup> Uma evidência de produção intratecal de anticorpos anti-*Treponema pallidum* e, portanto, de neurosífilis, seria a maior “carga” desses anticorpos no líquido cefalorraquidiano do que no soro. Essas cargas correspondem ao título de anticorpos por miligrama de IgG e são calculadas dividindo-se o título obtido pela quantidade respectiva de IgG, em miligramas.

Os achados de anticorpos IgM anti-*T. pallidum* no líquido cefalorraquidiano têm sido indicados como de valor diagnóstico de neurosífilis. Em 6 casos de neurosífilis sintomática houve positividade do ELISA-IgM, tendo sido negativos em 9 casos de neurosífilis assintomática, em 20 de sífilis recente ou latente, tratados ou não, e em 98% de 494 líquidos de não sifilíticos. Porém, não mostraram maior valor para o seguimento terapêutico.

Na ausência de outros processos neurológicos, como infecção pelo HIV, a pleocitose linfocitária no líquido cefalorraquidiano é o melhor indício de atividade da neurosífilis, e a contagem de células, o melhor indicador da resposta terapêutica. A quantidade de células tende a normalizar-se entre 6 e 18 meses após o tratamento.<sup>29</sup> Outra evidência da atividade são os níveis elevados de proteínas líquóricas.

Os testes de cardiolipina no líquido cefalorraquidiano podem mostrar decréscimo de títulos entre o 3º e o 6º mês pós-tratamento, mas se mantêm positivos geralmente por longo tempo, de meses ou anos.

A detecção do DNA de *Treponema pallidum* no líquido cefalorraquidiano pela PCR não se mostrou sensível para diagnóstico da neurosífilis, nem adequada para seguimento terapêutico, pois pode se manter positiva até por anos após tratamento em pacientes “cl clinicamente curados”.<sup>42-46</sup>

### ■ Sífilis congênita

São suspeitos de sífilis congênita todos os recém-nascidos de parturientes portadoras de sífilis não tratada ou insuficientemente tratada. É de 50% ou mais a probabilidade de transmissão placentária nas sífilis primária e secundária, não tratadas, insuficientemente tratadas, ou que foram submetidas a tratamento em data muito próxima ao parto, sendo mesmo referidas porcentagens de 70 a 100% de transmissão congênita quando considerados os quatro primeiros anos depois da infecção materna. Entretanto, a infecção congênita pode ocorrer em casos de gestante com sífilis latente e, ocasionalmente, mesmo com sífilis tardia ou terciária. Em cerca de 40% dos casos de transmissão congênita há morte fetal por abortamento espontâneo, além de elevada morbimortalidade perinatal.

O diagnóstico da sífilis congênita fundamenta-se nos antecedentes maternos e nos exames clínicos e laboratoriais, mas nem sempre se consegue um diagnóstico de certeza que torne possível excluir a infecção, na ausência de evidências marcantes da resposta humoral e de sinais clínicos, pois, com frequência, a sífilis congênita é assintomática. Nesses suspeitos sem confirmação laboratorial, a terapêutica e o seguimento da criança ao longo do primeiro ano de vida são indicados.<sup>1-6</sup>

### Diagnóstico laboratorial da sífilis congênita

#### Pesquisa do treponema

Nos casos sintomáticos, a pesquisa do treponema em raspado de lesões cutâneas, nas lesões mucosas ou na secreção nasofaríngea torna possível um diagnóstico bacteriológico. Entretanto, a evidenciação do treponema no líquido cefalorraquidiano poderia ser de grande valor para o diagnóstico da neurosífilis congênita, que se acredita ocorrer em cerca de 60% dos casos. Sánchez *et al.*<sup>29</sup> puderam detectar DNA de *T. pallidum* pela PCR no líquido cefalorraquidiano em 86% de casos sintomáticos de sífilis congênita, mas em apenas 8% de recém-nascidos assintomáticos de gestantes com sífilis recente não tratada.

#### Testes sorológicos

O significado de testes positivos, de cardiolipina ou treponêmicos, no soro do recém-nascido, é limitado pela transferência passiva de anticorpos IgG maternos. Entretanto, os títulos destes tendem a cair e se negatizar ao fim de alguns meses, enquanto mantidos ou em ascensão na sífilis congênita. Títulos do VDRL quatro vezes ou mais acima dos títulos maternos são evidência de infecção congênita.<sup>32-36</sup> Na prevenção da infecção congênita, toda gestante deve ser submetida a testes para a sífilis já no início da gravidez, repetidos no terceiro trimestre da gestação, bem como no sangue da parturiente, do cordão ou do recém-nascido, pelo risco de contágio materno no fim da gestação. A negatividade sorológica do recém-nascido não exclui a infecção, quando transmitida por parturiente ainda na fase pré-sorológica da sífilis. Deste modo, nos casos epidemiologicamente suspeitos, no recém-nascido soronegativo os testes sorológicos devem ser repetidos após o 3º mês de vida, pela possibilidade de positividade tardia. Como para outras infecções congênitas, a pesquisa de anticorpos IgM no soro do recém-nascido é de grande valor para o diagnóstico da sífilis congênita. O teste FTA-Abs-IgM foi utilizado por nós, e pudemos observar resultados positivos em 13 de 20 casos de sífilis congênita sintomática.<sup>47</sup> Entretanto, esse teste apresenta de 20 a 40% de resultados falso-negativos, resultantes do bloqueio da reação dos anticorpos IgM por competição dos anticorpos IgG presentes no soro. Há, também, elevada porcentagem, de 10% ou mais, de resultados falso-positivos, causados pela interferência de fatores reumatóides, de ocorrência frequente no soro de recém-nascidos. Ambas estas interferências podem ser afastadas pela remoção prévia destas IgG das amostras, ou pela realização do teste com a fração IgM (19S) do soro. Dentre esses procedimentos, é mais eficiente a precipitação das IgG da amostra de soro a testar, por anticorpo anti-IgG.<sup>23</sup> Tem sido descrita maior sensibilidade e especificidade para a pesquisa de anticorpos IgM pela técnica de *immunoblot*, em pequenas tiras de nitrocelulose (*miniblots*) contendo as diferentes frações antigênicas do treponema. É referida a reatividade de anticorpos IgM, principalmente com as frações de 47; 45; 42,5; 37 e 15,5 kDa, sendo considerada mesmo como



um marcador da infecção congênita a reação com a fração de 47 kDa, detectável muito mais frequentemente em soro em relação a líquido cefalorraquidiano. Entretanto, as pesquisas de anticorpos IgM antitreponêmicos ainda não são aplicáveis como rotina no diagnóstico da sífilis congênita.<sup>48-50</sup>

A detecção de *Treponema pallidum* por PCR em líquido amniótico, ou ainda em soro e líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos, tem apresentado sensibilidade, variando entre 78 e 86%, com especificidade de 100%, o que demonstra que este tipo de detecção pode constituir ferramenta diagnóstica importante em futuro próximo, na dependência da disponibilização de testes comerciais suficientemente validados em ensaios clínicos.<sup>8,10,12,15</sup>

## ► Referências bibliográficas

- Lee V, Kinghorn G. Syphilis: an update. Clin Med 2008; 8: 330-333.
- Charo JR, Khurana RN, Fawzi AA *et al.* Syphilis: Reemergence of an old adversary. Am Acad Ophthalmol 2006; 113: 2074-2079.
- Cavanaugh CE, Hedden SL, Latimer WW. Sexually transmitted infections among pregnant heroin- or cocaine-addicted women in treatment: the significance of psychiatric comorbidity and sex trade. Int J STD AIDS 2010; 21(2): 141-142.
- Flom PL, Friedman SR, Kottiri BJ *et al.* Stigmatized drug use, sexual partner concurrency, and other sex risk network and behavior characteristics of 18- to 24-year-old youth in a high-risk neighborhood. Sex Transm Dis 2001; 28 (10): 598-607.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Programa DST/AIDS. Guia de Vigilância Epidemiológica, 7ª ed. 2006.
- Ramos Jr. AN, Matilda LH, Saraceni V *et al.* Control of mother-to-child transmission of infectious diseases in Brazil: progress in HIV/AIDS and failure in congenital syphilis. Cadernos de Saúde Pública 2007; 23 Sup 3: 5370-5378.
- Gordon, SM, Eaton ME, George R *et al.* The response of symptomatic neurosyphilis to high-dose intravenous penicillin G in patients with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1994; 331: 1469-1473.
- Sánchez PJ, Wendel VD Jr, Grimpel E *et al.* Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum*. J Infect Dis 1993; 167: 148-157.
- Horowitz HW, Valsamis MP, Wicher V *et al.* Brief report: cerebral syphilitic gumma confirmed by the polymerase chain reaction in a man with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1994; 331: 1488-1491.
- Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA *et al.* Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 62-69.
- Castro MJ, Prieto E, Águas MJ *et al.* Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. Int J STD AIDS 2007; 18 (12): 842-845.
- Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trallu L *et al.* Assessment of a novel real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. Sex Transm Infect 2009; 85 (4): 264-269.
- Booth J, Rodger A, Singh J *et al.* Syphilitic panuveitis with retinal necrosis in a HIV positive man confirmed by *Treponema pallidum* PCR. J Infect 2009; 59 (5): 373-375.
- Dow BC, Franklin IM, Munro H. Syphilis nucleic acid testing: usefulness in syphilis confirmation? Transfusion 2010; 50: 737-739.
- Heymans R, Van Der Helm JJ, De Vries HJ *et al.* Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 2010; 48 (2): 497-502.
- Castro R, Prieto E, Águas MJ *et al.* Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp *pallidum* in Lisbon, Portugal. J Clin Microbiol 2009; 47 (8): 2510-2512.
- Martin IE, Gu W, Yang Y *et al.* Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. Clin Infect Dis 2009; 49 (4): 515-521.
- Jorge JC. Controle de qualidade de reações sorológicas para a sífilis em laboratórios de saúde em Florianópolis. Tese. Faculdade de Saúde Pública, USP, 1984.
- Nelson, RA, Meyer, MM. Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection. J Exp Med 1949; 89: 369-393.
- Hunter EF, Deacon WE, Meyer PE. An improved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS). Publ Health Rep 1962; 79: 410-412.
- Larsen SA, Farshy, CE, Pender BJ *et al.* Staining intensities in the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-Abs) test: Association with the diagnosis of syphilis. Sex Transm Dis 1986; 13: 221-227.
- Ozanne G, D'halewyn Ma, Larsen Sa. Comparison of the fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-Abs) test with the FTA-Abs double staining test for detection of antitreponemal immunoglobulin M in the 19S fraction of human serum. J Clin Microbiol 1993; 31(1): 102-106.
- Martins TB, Jaskowski TD, Mouritsen CL *et al.* An evaluation of the effectiveness of three Immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2: 98-103.
- Cheng JQ, Zhou H, Hong FC *et al.* Syphilis screening and intervention in 500,000 pregnant women in Shenzhen, the People's Republic of China. Sex Transm Infect 2007; 83(5): 347-350.
- Rathlev T. Hemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* on the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967; 43: 181-185.
- Camargo ME, Ferreira AW, Rocca A. Hemapallidum, reagente nacional para o teste treponêmico de hemaglutinação para a sífilis. Avaliação dos resultados. Rev Bras Patol Clin 1987; 23: 42-45.
- Van Voorlin WC, Barrett LK, Lukehart SA *et al.* Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92 and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*. J Clin Microbiol 2003; 41 (8): 3668-3674.
- Miranda APF, Sato NS. Profile of anti-Tp47 antibodies in patients with positive serology for syphilis analyzed by Western Blot. Braz J Infect Dis 2008; 12 (2): 139-143.
- Sánchez PJ, McCracken Jr GH, Wendel GD *et al.* Molecular analysis of the fetal IgM response to *Treponema pallidum* antigens: Implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. J Infect Dis 1989; 159: 508-517.
- Lam TK, Lau HY, Lee YP *et al.* Comparative evaluation of the INNO-LIA syphilis score and the MarDx *Treponema pallidum* immunoglobulin G Marblot test assays for the serological diagnosis of syphilis. Int J STD AIDS 2010; 21 (2): 110-113.
- Chuck A, Ohinma AA, Tilley P *et al.* Cost effectiveness of enzyme immunoassay and immunoblot testing for the diagnosis of syphilis. Int J STD AIDS 2008; 19 (6): 393-399.
- World Health Organization (WHO). *Treponemal* infection: report of a WHO Scientific Group. Technical report series 674, Geneva, 1982.
- Pattman RS. *Treponemal* infection: report of a WHO Scientific Group Technical report. Br J Vener Dis 1982; 58: 410. Atualizações disponíveis em <http://sti.bmj.com/contents/5816/410.2.contents>.
- Centers for Disease Control (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Morb Mortal Wkly Rep (MMWR) 2006; 55: 1-94.
- French P, Gomberg M, Janier M *et al.* IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. Int J STD AIDS 2009; 20 (5): 300-309.
- González-López JJ, Guerrero ML, Luján R *et al.* Factors determining serologic response to treatment in patients with syphilis. Clin Infect Dis 2009; 49(10): 1505-1511.
- Lukehart S A, Godornes C, Molini B J *et al.* Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. N Engl J Med 2004; 351: 154-158.
- Ghanem KG, Erbeling EJ, Wiener ZS *et al.* Serological response to syphilis treatment in HIV-positive and HIV-negative patients attending sexually transmitted diseases clinics. Sex Transm Infect 2007; 83(2): 97-101.
- Farhi D, Benhaddou N, Grange P *et al.* Clinical and serologic baseline and follow-up features of syphilis according to HIV status in the post-HAART era. Medicine (Baltimore) 2009; 88(6): 331-340.
- Musher DM. Neurosyphilis: diagnosis and response to treatment. Clin Infect Dis 2008; 47(7): 900-902.
- Marra CM, Maxwell CL, Tantaló LC *et al.* Normalization of serum rapid plasma reagin titer predicts normalization of cerebrospinal fluid and clinical abnormalities after treatment of neurosyphilis. Clin Infect Dis 2008; 47(7): 893-899.
- Castro R, Prieto ES, Da Luz Martins Pereira F. Nontreponemal tests in the diagnosis of neurosyphilis: an evaluation of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) and the Rapid Plasma Reagin (RPR) tests. J Clin Lab Anal 2008; 22(4): 257-261.
- Machado, ABB, Bassi GE, Silva SM *et al.* Contribuição da reação de micro-hemaglutinação passiva para o *Treponema pallidum* (MHA-TP) no líquido cefalorraquidiano ao diagnóstico da neurosífilis. Arq. Neuro-Psiquiat (São Paulo) 1998; 46: 369-373.
- Bollensen E, Albrecht S, Beuche W *et al.* Reactivity of locally produced CSF antibodies in patients with neurosyphilis against antigens of *Treponema pallidum*. J Neurol 1993; 240(8): 471-474.
- Ee JB, Farshy CE, Hunter EF *et al.* Detection of immunoglobulin M in cerebrospinal fluid from syphilis patients by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1986; 24: 736-740.



46. Noordhoek GT, Wolters EC, Marjolijn EJJ *et al.* Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. J Clin Microbiol 1991; 29: 1976-1984.
47. Kipnis J, Camargo ME, Fava Netto C *et al.* Neonatal congenital syphilis diagnosis by the anti IgM treponemal fluorescent test. Rev Inst Med Trop São Paulo 1971; 13: 179-183.
48. Dorfam DH, Glaserm JH. Congenital syphilis presenting in infants after the newborn period. N Engl J Med 1990; 323: 1299-1302.
49. Stoll BJ, Lee FK, Larsen S *et al.* Clinical and serologic evaluation of neonates for congenital syphilis: A continuing diagnostic dilemma. J Infect Dis 1993; 167: 1093-1099.
50. Herremans M, Notermans DW, Mommers M *et al.* Comparison of a *Treponema pallidum* IgM immunoblot with a 19S fluorescent treponemal antibody absorption test for the diagnosis of congenital syphilis. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59 (1): 61-66.



## Capítulo 20

---

# Tuberculose

*Olavo Henrique Munhoz Leite e  
Kelly Aparecida Kanunfre*

- Introdução, 243
- Diagnóstico clínico-laboratorial, 244
- Micobacterioses, 248
- Referências bibliográficas, 252



## ► Introdução

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que acomete principalmente os pulmões, podendo, porém, afetar outros órgãos e tecidos do organismo. O agente etiológico da tuberculose humana pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium*. O complexo *M. tuberculosis* é constituído por cinco espécies de micobactérias intimamente relacionadas: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii*.<sup>1,2</sup>

*M. tuberculosis* é um bacilo delgado, ligeiramente encurvado, de 1 a 4 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, intracelular aeróbico estrito, não produtor de toxinas. Tem crescimento lento – cerca de 4 a 8 semanas para formar colônias visíveis em meios de cultura.<sup>2,3,4</sup> A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa pelo ar, pela inalação de gotículas expelidas por indivíduo com a forma pulmonar ou laríngea da doença. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleo de Wells), partículas de 1 a 5 µm de diâmetro que contêm 2 a 3 bacilos, conseguem atingir os alvéolos pulmonares e dar início à multiplicação. Embora a fagocitose aconteça e alguns dos bacilos sejam destruídos, um maior número permanece vivo dentro do fagossomo do macrófago. A sobrevivência do patógeno dentro da célula é mediada principalmente pela sua habilidade de interferir na maturação do fagossomo, impedindo a acidificação do microambiente – fundamental para a fusão fago-lisossomo –, o que permite sua multiplicação nos estágios iniciais da infecção.<sup>5,6</sup>

### ▪ Aspectos epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 95% dos casos de tuberculose ocorrem nos países em desenvolvimento, atingindo todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos.<sup>7</sup> A tuberculose a cada ano é responsável por 9 milhões de casos novos e aproximadamente 2 milhões de óbitos.<sup>8</sup>

Em 2009, foram estimados 9,4 milhões de casos novos de tuberculose, o que corresponde a 137 casos por 100.000 habitantes. Desses, 55% ocorreram na Ásia, 30% na África, 4% na Europa; 7% regiões do Mediterrâneo Oriental e 3% nas Américas do Norte, Central e do Sul. Entre os 22 países mais acometidos pela doença, a Índia foi o que apresentou o maior número de casos novos (2 milhões), seguidos pela China com 1,3 milhão, África do Sul, Nigéria e Indonésia com cerca de 490 mil, 460 mil e 430 mil casos novos, respectivamente.<sup>9</sup>

Um fato preocupante é o aumento dos casos de tuberculose causada por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos. Em 2008, foram estimados 440 mil casos de tuberculose multirresistente (TB MDR) e 150 mil óbitos.<sup>10</sup> É considerado TB MDR quando a cepa de *M. tuberculosis* é resistente a rifampicina e isoniazida. O tratamento desses pacientes ainda é um desafio, sendo necessário o uso de fármacos de segunda linha, incluindo antibióticos injetáveis, o que torna o tratamento mais oneroso, com efeitos colaterais mais graves, os quais estendem o período de tratamento de 6 meses para 2 anos.<sup>8</sup> Dentre os 27 países com as maiores estimativas de casos de TB MDR, a China ocupa a primeira posição com aproximadamente 100 mil casos, seguida pela Índia, Federação Russa e África do Sul com 99 mil, 38 mil e 13 mil casos, respectivamente.<sup>9</sup>

Segundo a OMS, 69 países relataram pelo menos um caso de tuberculose extensivamente resistente (TB XDR) em 2010.

Acredita-se que muitos casos de TB XDR não sejam diagnosticados devido às precárias situações dos laboratórios para realizar o teste de sensibilidade aos fármacos de segunda linha. Existe uma estimativa de que aproximadamente 25 mil casos de TB XDR emergem a cada ano.<sup>10</sup> É considerada TB XDR quando cepas de *M. tuberculosis* são resistentes à rifampicina e à isoniazida acrescidas à resistência a uma fluoroquinolona e a um fármaco injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina).<sup>10</sup>

Com relação à mortalidade, em 2009, a tuberculose foi responsável pelo óbito de 1,7 milhão de pessoas, o que corresponde a 26 mortes por 100 mil habitantes/ano ou aproximadamente 4.700 pessoas/dia. A tuberculose é a oitava causa de morte em países de baixa e média renda; e nos indivíduos entre 15 e 59 anos é a terceira causa de morte, depois do HIV/AIDS e doenças do coração (infarto).<sup>8</sup>

No Brasil foram notificados, em 2008, pelo SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação) do Ministério da Saúde, 71.059 casos novos de tuberculose, o equivalente a 37,48 casos por 100 mil habitantes. Na distribuição de casos novos por unidade federada, os estados do Rio de Janeiro, Amazonas, Pernambuco, Pará, Ceará, Rio Grande do Sul e Acre são os que têm as maiores taxas de incidência da doença entre 39,1 e 69,64/100.000.<sup>11</sup> Foram registrados, em 2008, 356 casos de tuberculose multirresistente e quatro casos de TB XDR.

De acordo com os dados do Ministério da Saúde, foram registrados 4.735 óbitos por tuberculose em 2007, correspondendo a 2,5 óbitos/100.000. As maiores taxas de mortalidade foram observadas nos estados do Rio de Janeiro, Pernambuco e Acre: 4,0; 4,9 e 5,2/100.000, respectivamente.<sup>11</sup>

### Coinfecção tuberculose/HIV

A pandemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um dos maiores desafios para o controle da tuberculose. A associação dessa coinfecção é sinérgica, interativa e com significativo impacto em todo o mundo. O aumento na viremia plasmática com a imunossupressão eleva o risco de desenvolver TB, variando de 37 a 162%, dependendo do estágio da imunossupressão, assim como acelera a progressão da doença, especialmente no contexto de exposição a cepas resistentes (MDR).<sup>12,13</sup> O diagnóstico da TB torna-se mais difícil em indivíduos infectados pelo HIV.

Dos 33,3 milhões de indivíduos HIV-positivos no mundo estima-se que 12 a 14 milhões estejam coinfectados pelo *M. tuberculosis*.<sup>14</sup> Em 2009, dos 9,4 milhões de casos novos de tuberculose, 1,2 milhão ocorreram em indivíduos infectados pelo HIV, sendo que 80% desses ocorreram na África Subsaariana. O número de óbitos em coinfectados foi estimado em aproximadamente 0,4 milhão no mesmo ano.<sup>9</sup>

A tuberculose é a principal causa de morte entre os infectados pelo HIV e o diagnóstico dessa doença permanece um desafio em pacientes HIV-positivos devido às apresentações atípicas da tuberculose.

### ▪ Aspectos clínicos

#### Tuberculose pulmonar

O pulmão é a porta de entrada natural do *M. tuberculosis*; neste órgão as manifestações clínicas são mais frequentes e de maior importância epidemiológica. Após a infecção primária, a maioria dos indivíduos bloqueará a multiplicação dos bacilos com o desenvolvimento de resposta imune específica repre-



sentada pelo granuloma e sua posterior calcificação. Antes do desenvolvimento dessa resposta, o bacilo poderá disseminar-se pelos diversos órgãos e sistemas através das vias linfáticas e hematogênicas, sendo também contido nestes locais com o desenvolvimento da resposta específica.<sup>15</sup> Uma pequena parte desses indivíduos recém-infectados poderá progredir para a forma grave da doença,<sup>16</sup> representada por acometimento sistêmico, incluindo principalmente o sistema nervoso central (SNC), pulmões e órgãos linfáticos. São fatores predisponentes para esta progressão a baixa idade e situações imunossupressoras. Nos dois anos subsequentes ao contato primário, no entanto, de 3 a 5% destes indivíduos desenvolverão doença ativa e o risco de desenvolvimento da enfermidade após este período é de 5 a 7% por toda a vida (reativação endógena); nestas situações, o indivíduo infectado pelo bacilo desenvolverá a tuberculose secundária, sendo o principal órgão acometido os pulmões. Tosse prolongada, febre, sudorese noturna, emagrecimento e hemoptóicos são as manifestações mais comuns nessas situações. A reinfeção (exógena) representa uma nova exposição em um indivíduo cuja infecção primária já ocorreu. Essas situações têm sido descritas entre indivíduos hígidos e naqueles com outras morbidades, como doenças e terapias imunossupressoras.

### **Tuberculose extrapulmonar**

Todos os órgãos e sistemas podem ser acometidos pela tuberculose de maneira isolada ou em mais de um órgão. Os mais comumente envolvidos na tuberculose extrapulmonar são os linfonodos periféricos, o sistema urogenital, os ossos e articulações, o fígado e baço, o sistema nervoso central e a pele. Os sinais e sintomas associados a cada uma dessas localizações são variados e dependentes do órgão acometido e do estado imunológico do indivíduo.

### **Tuberculose disseminada**

Quando as disseminações hematogênica e linfática são amplas e maciças, produzindo comprometimento sistêmico generalizado, a condição é chamada tuberculose disseminada ou miliar. Esse estado resulta da “semeadura bacilar” em numerosos tecidos do organismo e, como consequência, ocorrem pequenas lesões semelhantes a pequenos grãos de milho (miliar). A tuberculose disseminada é encontrada com mais frequência em lactentes, em crianças menores de cinco anos e em pacientes imunossuprimidos.

## **► Diagnóstico clínico-laboratorial**

O diagnóstico da tuberculose é estabelecido com o encontro inicial dos bacilos álcool-acidoresistentes (BAAR) em materiais biológicos seguido pela cultura destes com a identificação da micobactéria. Qualquer material biológico deve ser cultivado e o encontro de BAAR não é diagnóstico definitivo da doença, pois outras micobactérias, outras bactérias e artefatos podem ser BAAR. O quadro clínico sugestivo, nas várias localizações da tuberculose, deve ser complementado por exames suplementares.

### **▪ Métodos de imagem**

A radiografia é um método simples e bastante útil no diagnóstico da tuberculose pulmonar com infiltrados característicos nos ápices pulmonares, formações de cavernas e focos

de disseminação broncogênica. Os métodos radiológicos com contraste têm grande importância na tuberculose urinária e genital por meio da urografia excretora e histerossalpingografia; nas formas intestinais, a partir do trânsito intestinal e enema opaco. As formas extrapulmonares e pulmonares da doença podem ser melhor caracterizadas com a tomografia computadorizada, ressonância magnética e métodos de medicina nuclear, sendo importante para as localizações do SNC, abdominal, osteoarticular, ganglionar e torácica, entre outras.

### **▪ Diagnóstico etiológico**

#### **Espécimes clínicos**

De acordo com a suspeita clínica de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar, diversos espécimes clínicos podem ser empregados para a pesquisa de micobactérias, tais como escarro, escarro induzido, lavado broncoalveolar, lavado gástrico, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, líquido pericárdico, materiais de biopsia e outros. Alguns procedimentos técnicos devem ser considerados para a coleta, conservação e transporte desses materiais.

► **Escarro de expectoração.** A amostra qualitativamente melhor para a pesquisa de BAAR é aquela que provém da árvore traqueobrônquica e obtida após o esforço de tosse. O volume ideal é de 5 a 10 mL. O material coletado por aspiração de secreções nasais ou de esfregaço de faringe não é adequado para o exame. O escarro deve ser colhido em potes plásticos descartáveis, transparentes, de 35 a 50 mL, com boca de 50 mm de diâmetro e tampa rosqueada. A amostra deve conter o nome do paciente e a data da coleta. Duas a três amostras devem ser coletadas preferencialmente de manhã, ao acordar.

► **Lavado gástrico.** Para a obtenção desse material, requer-se a hospitalização do paciente, uma vez que deve ser coletado pela manhã no instante em que o paciente acorda e antes da primeira refeição. São necessárias duas ou três amostras coletadas em dias consecutivos, em recipientes individuais.

► **Lavado brônquico.** Trata-se de um procedimento invasivo realizado com fibroscópio e exclusivamente por médico especializado. Colhe-se o lavado ou escovado broncoalveolar. Pode-se também realizar uma biopsia transbrônquica, quando indicado. Esse procedimento induz à expectoração por vários dias, e devem ser coletados exames de escarro após o procedimento.

► **Expectoração induzida.** O material é coletado com o auxílio de inalação de solução salina hipertônica, aerossolizada, que irrita as mucosas e induz a tosse.

► **Urina.** Deve ser coletada toda a urina da primeira micção matinal; faz-se a higiene íntima do paciente e coleta-se o material em frasco limpo e de boca larga, de 300 a 500 mL; são necessárias 3 a 6 amostras coletadas em dias consecutivos.

► **Sangue.** Quando se suspeita de bacteriemia, é recomendada a pesquisa de micobactéria no sangue. Esse material deve ser coletado assepticamente (5 mL de sangue) com anticoagulante (EDTA). Cada fabricante fornece o frasco específico para a metodologia a ser empregada.

► **Biopsia.** Todos os materiais biológicos obtidos por biopsia devem ser cultivados, além do fragmento enviado para estudo anatomopatológico. O material para biopsia deve ser enviado ao laboratório de microbiologia o mais rápido possível em frasco estéril em solução salina ou seco, dependendo do tempo necessário para o processamento.

► **Outros materiais.** Líquidos cefalorraquidiano, pleural, pericárdico, peritoneal, sinovial e ascítico devem ser coletados



asépticamente, e a semeadura desses materiais deve ser imediata, em meios de cultura específicos para pesquisa da micobactéria.

O sucesso do isolamento de micobactérias dos diversos materiais começa com a coleta e encaminhamento ao laboratório. Preferencialmente, os espécimes devem ser coletados antes do início do tratamento. Todos os materiais devem ser enviados o mais rápido possível ao laboratório para serem processados. Se o transporte imediato não for possível, o material deve ser refrigerado por até 24 h. Atrasos no processamento desses materiais poderá levar a resultados de cultura falso-negativos e aumento da contaminação bacteriana.<sup>19</sup>

### Baciloscopia

É um teste simples, rápido, de baixo custo, que permite quantificar o número de bacilos presentes no espécime clínico.<sup>20,21</sup> É o teste inicial que deve ser realizado para o diagnóstico da tuberculose, embora apresente sensibilidade inferior à cultura. No Brasil, a coloração de Ziehl-Neelsen é a mais utilizada. Nessa técnica, os BAAR coram-se em vermelho pela fucsina fenicada, em contraste com uma coloração de fundo de azul de metileno. Um mínimo de  $5 \times 10^3$  organismos/mL de escarro são necessários para uma baciloscopia positiva, cujo resultado é expresso quantitativamente da seguinte maneira:

- (-) Não encontrado BAAR em 100 campos observados
- (+) Menos de um BAAR por campo em 100 campos observados
- (++) De 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados
- (+++) Mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados.

Em pacientes com tuberculose pulmonar, a sensibilidade da baciloscopia varia de 50 a 80%; nos indivíduos paucibacilares é de aproximadamente 50%; em crianças, pacientes coinfectados pelo HIV e em pacientes com tuberculose extrapulmonar, a variação da sensibilidade é de 35 a 70%. Diversos fatores influenciam a sensibilidade da baciloscopia, como o número de bacilos presentes nos espécimes clínicos; a habilidade e experiência do microscopista; o número de amostras analisadas por dia; o tratamento dado à amostra (liquefação ou concentração) e o preparo da lâmina.<sup>21-27</sup>

Pode-se empregar também um método de coloração fluorescente, que é de leitura mais fácil e oferece melhor contraste na microscopia. A lâmina de esfregaço é corada com uma solução de auramina fenicada a 0,01% em álcool etílico a 95%. O BAAR emite fluorescência amarelo-alaranjada sobre o fundo negro de permanganato. A contagem dos BAAR deve ser a mesma utilizada na coloração de Ziehl-Neelsen, dividida por um fator de correção, pois é maior o número de BAAR visualizado por campo microscópico. Este tipo de coloração é utilizado como método de triagem, apresenta maior vantagem que a técnica anterior quanto à biossegurança, sendo, porém, de custo maior para o laboratório. Os exames positivos devem ser confirmados pela técnica de Ziehl-Neelsen. Na interpretação de uma baciloscopia positiva deve ser considerado que outros organismos, além das micobactérias, podem ser parcialmente acidorresistentes como, por exemplo, *Nocardia* sp, *Legionella micdadei* e *Rhodococcus* sp. A coleta de três amostras, em dias consecutivos, aumenta a sensibilidade do método.<sup>28</sup>

A baciloscopia positiva somada a um quadro clínico e radiológico compatíveis são altamente sugestivos de tuberculose, particularmente nos locais de alta prevalência da doença. No entanto, devem ser feitos os exames de cultura e identifica-

ção para a confirmação da espécie. Isso tem maior importância nos pacientes com história prévia de tratamento de tuberculose e naqueles com comprometimento da imunidade, em especial nos pacientes infectados pelo HIV.

### Cultura

O isolamento do bacilo da tuberculose pela cultura permanece como diagnóstico definitivo (*gold standard*), da doença. Os espécimes clínicos apresentam frequentemente bactérias contaminantes de rápido crescimento, que podem interferir no isolamento de *M. tuberculosis*. Dessa maneira, o escarro e outros espécimes devem ser previamente tratados com agentes químicos para a remoção dos contaminantes. Após esse tratamento químico, o material é cultivado em meio de cultura sólido seletivo, como o Lowenstein-Jensen (LJ) ou Middlebrook 7H10 e incubado a 37°C por 8 semanas, com observações semanais. Uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> estimula o crescimento do bacilo da tuberculose. As culturas devem ser avaliadas semanalmente até completarem, no mínimo, 60 dias; já as amostras de escarro com baciloscopia positiva mostram crescimento em cerca de 2 a 3 semanas enquanto as negativas e provenientes de outros materiais que não o escarro tornam-se positivas após 6 a 8 semanas.

A cultura apresenta sensibilidade superior à baciloscopia (80 a 96%), detectando menos de 10 bacilos/mL de espécime clínico. É a partir da cultura que podemos diferenciar *M. tuberculosis* de outras micobactérias por testes bioquímicos ou moleculares, como também avaliar a suscetibilidade do bacilo aos fármacos.<sup>1,21</sup>

A cultura permanece como um método de grande auxílio no diagnóstico de indivíduos com suspeita de tuberculose pulmonar, com resultado negativo na baciloscopia, em casos de tuberculose extrapulmonar e também no diagnóstico da tuberculose em pacientes coinfectados pelo HIV.

Um fator limitante da cultura é o tempo necessário para a liberação do resultado, devido ao lento crescimento bacilar. Meios líquidos podem ser utilizados, como o caldo Kirchner, ao qual uma mistura de antibióticos é adicionada para inibir o crescimento de outras bactérias. Sendo um meio líquido, a interpretação dos resultados torna-se mais difícil, sendo necessária a centrifugação do meio e a realização da pesquisa de BAAR. Caso o resultado seja positivo, uma subcultura deve ser realizada no meio de LJ, aumentando ainda mais o prazo para o diagnóstico definitivo.<sup>19</sup> Novas tecnologias foram desenvolvidas nos últimos anos visando ao isolamento mais rápido dessas micobactérias.

### Sistemas automatizados de cultura

O sistema BACTEC™ 460TB (Becton Dickinson, Sparks, MD) é um método em que a amostra é semeada em meio de cultura Middlebrook 7H12 contendo como substrato o ácido palmítico marcado com carbono 14. O crescimento bacteriano metaboliza o substrato produzindo <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, o qual é monitorado pelo BACTEC™ 460TB. A produção de CO<sub>2</sub> está diretamente relacionada com o grau de crescimento bacteriano e é demonstrada na máquina como índice de crescimento (GI) entre 1 e 999. Uma vez que o GI tenha atingido 30, isto é marcado como positivo; entretanto, uma pesquisa de BAAR deve ser realizada para confirmar o resultado. Em geral, o crescimento de *M. tuberculosis* leva de 7 a 10 dias, o que representa um grande avanço quando comparado à cultura em meio sólido. Nesse meio podem ser utilizados todos os espécimes obtidos para o diagnóstico de tuberculose, com exceção do sangue e medula óssea. O sistema BACTEC™ 460TB é semiautomatizado, pois



as medidas são tomadas manualmente. Além disso, o uso de material radioativo acarreta problemas na estocagem e no descarte. Esse sistema tem sido substituído pelo BACTEC™ MGIT™ 960TB.<sup>29</sup>

O sistema BACTEC™ MGIT™ 960TB (Becton Dickinson, Sparks, MD) é um método automatizado para isolamento primário de micobactérias a partir de amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares (exceto sangue) e teste de sensibilidade a antibióticos para *Mycobacterium tuberculosis*.

Nessa metodologia, a amostra é semeada em meio de cultura Middlebrook 7H9, o qual contém um composto fluorescente, embebido em silicone, sensível ao oxigênio dissolvido no meio. Inicialmente, uma grande quantidade do oxigênio dissolvido extingue as emissões do composto e pouca fluorescência pode ser detectada. Com o crescimento da micobactéria, cresce também o consumo de oxigênio, o que ocasiona a emissão da fluorescência e sua detecção pelo equipamento.

As leituras da fluorescência são realizadas de maneira contínua e simultânea, e um ciclo de leitura é completado a cada 60 min. Uma série de diodos emissores de luz (LED), localizados abaixo dos tubos, iluminam-se, ativando seus sensores fluorescentes. Os detectores de luz realizam, então, a leitura. As culturas positivas são imediatamente indicadas por meio de sinais luminosos e alarmes sonoros. Esse sistema possibilita a emissão de resultados de detecção e testes de sensibilidade em tempo bem menor do que os métodos convencionais (cerca 1 a 3 semanas).<sup>30</sup> Estudos de custo-efetividade sobre o uso do BACTEC™ MGIT™ 960TB no diagnóstico da tuberculose no Sistema Único de Saúde (SUS) estão em fase final de avaliação.<sup>31</sup>

Os sistemas de detecção microbiana MB/BacT® e o BacT/ALERT® MB (bioMérieux) são automatizados e utilizam um sensor colorimétrico e a reflexão da luz para monitorar a existência e a produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) dissolvido no meio de cultura (Middlebrook 7H9). Se houver microrganismos na amostra de teste, dióxido de carbono será produzido à medida que os microrganismos forem metabolizando os substratos do meio de cultura. Quando o crescimento de microrganismos produz CO<sub>2</sub>, a cor do sensor permeável a gás, instalado no fundo de cada frasco de cultura, muda de verde-azulado para amarelo. As cores mais claras resultam em um aumento da unidade de reflectância. É feita a reflectância do frasco, a qual é monitorada e registrada pelo aparelho a cada 10 min.

### Detecção do fator corda

O *microscopic observation broth drug susceptibility assay* (MODS), método não automatizado em meio líquido à base de ágar, permite, após 8 dias, visualizar o crescimento da micobactéria pela formação do fator corda, em microscópio com lente invertida e com filtro para campo escuro.<sup>32,33</sup> Estudos sugerem que a técnica MODS tem sensibilidade e especificidade similares aos métodos de cultura tradicionais. Apesar de diminuir o tempo de obtenção do resultado, esta metodologia necessita de técnicos de laboratório experientes e requer sala de cultura com nível de biossegurança 3 (NB-III) devido ao uso de meio líquido em placas de cultura.<sup>34</sup>

### Adenosina deaminase

Adenosina deaminase é uma denominação genérica dada a um grupo de enzimas com pesos moleculares distintos, que têm função química semelhante no metabolismo das purinas, catalisando a conversão da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxinosina, respectivamente.<sup>35</sup> A detecção

desta enzima intracelular presente particularmente nos linfócitos ativados, em amostras clínicas (fluidos), pode auxiliar no diagnóstico da TB pleural.

Teste colorimétrico com base na técnica de Giusti comercializado é de fácil execução em qualquer laboratório que disponha de espectrofotômetro. A determinação do aumento da atividade da ADA no líquido pleural (> 40 U/ℓ), sobretudo se associado a alguns parâmetros como idade (< 45 anos), predomínio de linfócitos (acima de 80%) e proteína alta (exsudatos), é indicadora de pleurite tuberculosa.<sup>36</sup>

Neves *et al.*<sup>37</sup> realizaram um estudo de metanálise para verificar a acurácia da adenosina deaminase no diagnóstico da TB pleural. Os autores verificaram que o teste apresentou sensibilidade de 91,8% e especificidade de 88,4%. O *odds ratio* foi de 112 e, considerando uma prevalência da TB pleural de 50% (considerada neutra), a probabilidade do diagnóstico pós-teste positivo foi de 88,7% e a sua exclusão após resultado negativo foi de 91,5%. Os autores concluem que o teste ADA apresenta alta acurácia no diagnóstico da TB pleural, devendo este ser utilizado na rotina de investigação da doença.<sup>37</sup>

## ■ Métodos imunológicos

### Detecção de anticorpos e antígenos

Atualmente, muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de melhorar o desempenho dos testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose, principalmente por serem testes de fácil execução, rápidos, passíveis de serem automatizados e implantados nos países em desenvolvimento.

A pesquisa de anticorpos por ELISA tem sido proposta utilizando antígenos de diferentes naturezas, classificados como totais, semipurificados, e purificados proteicos ou lipídicos. Antígenos totais, provenientes de filtrados de *M. tuberculosis* e sonificado de BCG, apresentaram número significativo de resultados positivos em indivíduos saudáveis e em pacientes não tuberculosos, portanto não são utilizados devido à baixa especificidade.

Nos últimos 20 anos, os avanços no conhecimento sobre a resposta imune humoral na tuberculose e as novas ferramentas utilizadas na genômica e proteômica levaram à descoberta de novos antígenos que têm apresentado melhores índices de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da tuberculose quando comparados aos primeiros antígenos utilizados em ensaios imunoenzimáticos.<sup>38</sup> O Quadro 20.1 resume informações do desempenho dos antígenos para a pesquisa de anticorpos específicos anti-*M. tuberculosis* no diagnóstico da doença.

Testes para a pesquisa de antígenos de *M. tuberculosis* podem fornecer rapidamente a evidência direta de doença ativa, o que os torna de grande interesse para o desenvolvimento de testes *point of care*, podendo ser utilizados em áreas de difícil acesso e com pouca infraestrutura. Diversos estudos foram realizados para a pesquisa de antígenos circulantes em amostras de soro, escarro e urina de pacientes com tuberculose.

Em estudo de metanálise foram revisados 47 artigos científicos que pesquisavam antígenos de *M. tuberculosis* em amostras de soro, escarro, urina, liquor, líquido pleural, aspirado de linfonodo. Entre os antígenos pesquisados nesses estudos estavam LAM, PPD, antígeno de 45/47 kDa, dos antígenos de 19, 38, 58 kDa, antígeno de 20 kDa, complexo antigênico 85, proteína de 38 kDa, Rv1656.



**Quadro 20.1 • Desempenho dos antígenos para a pesquisa de anticorpos específicos anti-*M. tuberculosis* no diagnóstico da tuberculose.<sup>38</sup>**

Antígenos		Estudos	Microscopia	Sensibilidade	Especificidade
Recombinante	38 kDa	12	Positiva	47	94
	Maleato sintetase	8	Positiva	73	98
	MPT51	5	Positiva	59	94
	MPT51	4	Positiva	58	97
	CFP-10	6	Positiva	48	96
	TBF6	4	Positiva	70	93
	TBF6, DPEP	4	Positiva	75	95
Proteína nativa	38 kDa	13	Positiva	49	97
	38 kDa	7	Negativa	31	97
	Ag 85B	4	Positiva	53	95
	Ag 85B	4	Positiva	62	97
	$\alpha$ -cristalina	6	Positiva	54	96
Lipídios	DAT	7	Positiva	63	81
	TAT	4	Positiva	81	44
	SL-I	4	Positiva	80	59
	Fator corda	5	Positiva	69	91

A sensibilidade dos testes para o diagnóstico da tuberculose pulmonar variou de 6 a 100% e a especificidade de 16 a 100%. Para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar os testes apresentaram índices de sensibilidade de 0 a 100% e especificidade de 62 a 100%.<sup>39</sup>

O desempenho dos testes está muito aquém dos parâmetros estabelecidos pela OMS para serem utilizados no diagnóstico da tuberculose; todavia existe um grande apelo por parte da própria OMS e das instituições internacionais envolvidas no controle da doença para buscar novos antígenos com potencial para diagnóstico, como também na melhora de alguns testes que apresentaram resultados preliminares promissores.

Até o momento, nenhum teste sorológico (para pesquisa de anticorpos ou antígenos) é recomendado pela Comunidade Internacional de Tuberculose para ser utilizado na rotina clínico-laboratorial de investigação da tuberculose.<sup>24–26,40</sup>

## Detecção de resposta celular

### Teste tuberculínico

Robert Koch, em 1890, preparou, a partir de culturas de bacilo da tuberculose, um produto denominado tuberculina, o qual passou a ser utilizado, após uma padronização internacional, na triagem da tuberculose (teste tuberculínico). Aqueles que já foram infectados por *M. tuberculosis* ou que receberam a vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) desenvolvem uma reação de hipersensibilidade tardia a esse produto, sendo considerados reatores a ele. O teste tuberculínico positivo não é diagnóstico da doença, indicando apenas que o paciente já foi exposto ao bacilo ou à cepa vacinal. Como a hipersensibilidade à tuberculoproteína pode persistir por muitos anos, esse teste é uma via efetiva para triagem de escolares, trabalhadores em áreas de saúde e de pacientes infectados pelo HIV, entre outros grupos. A reatividade à tuberculina desenvolve-se 6 a 8 semanas, em média, após a infecção ou a vacinação, e geralmente permanece por muitos anos ou por toda a vida. A reação positiva a essas proteínas em um indivíduo não imunizado é uma evidência de infecção recente ou remota e permite ao clínico determinar o histórico do paciente, anterior à prova da tuberculina.

A prova tuberculínica consiste na exposição a uma pequena dose de derivado proteico purificado (PPD), que é uma solução padrão obtida de filtrados de culturas autoclavadas de *Mycobacterium tuberculosis*. O PPD foi originalmente desenvolvido por Florence Siebert, em 1939, no Phipps Institute na Filadélfia. É um precipitado preparado a partir de filtrados da tuberculina velha (OT) com sulfato de amônio e ácido tricloroacético. A referência para todas as tuberculinas é o PPD-S (Siebert's Lot 49608).<sup>41</sup> Aplica-se 0,1 mL de PPD (equivalente a 5 ou 2 unidades de tuberculina) por via intradérmica, na região anterior do braço, para produzir ou não uma induração após 48 a 72 h. A partir da medida do diâmetro da induração, obtêm-se os seguintes resultados: 0 a 5 mm = não reator; 5 a 9 mm = reator fraco; e > 10 mm = reator forte. A reação positiva indica o contato com as proteínas da micobactéria, mas não necessariamente a doença ativa.

Conversores à tuberculina são aqueles indivíduos com teste cutâneo negativo que se torna positivo em um novo teste após 1 ano e que não apresentam evidências de doença ativa. Essas pessoas se infectaram recentemente e são candidatos a quimioprofilaxia.

### Detecção e quantificação de interferon-gama

Devido às limitações encontradas no teste tuberculínico, muitos estudos foram realizados na busca de metodologias alternativas que pudessem auxiliar no diagnóstico da tuberculose. Essa nova metodologia baseia-se na detecção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) produzida por células T após serem estimuladas por antígenos específicos.

Os primeiros estudos de detecção de IFN- $\gamma$  utilizavam como antígeno o PPD; posteriormente os ensaios passaram a utilizar antígenos específicos de *M. tuberculosis*, como o ESAT-6, CFP-10, principalmente porque os genes que codificam essas proteínas estão localizados na região RD1 do genoma do *M. tuberculosis*, a 1ª deleção encontrada quando comparados os genomas da cepa selvagem *M. bovis* e o da cepa vacinal BCG. Essa região é encontrada em todas as cepas virulentas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* e também está presente em algumas micobactérias ambientais não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, como *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. szulgai*.<sup>3,42–45</sup>



Comercialmente, estão disponíveis dois kits: QuantiFERON®-TB Gold In Tube (Cellestis Limited, Austrália), que utiliza os antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 e a detecção de IFN- $\gamma$  produzida é realizada pelo método ELISA; e T SPOT® TB (Oxford Immunotec, Inglaterra), que permite a contagem das células produtoras de IFN- $\gamma$  por ELISPOT.<sup>26,45-48,55</sup> Esses reagentes comerciais continuam sendo avaliados para a detecção da tuberculose infecção, doença ativa.

Em 2004, Mori *et al.* avaliaram a sensibilidade e especificidade do teste QuantiFERON®-TB Gold utilizando os antígenos ESAT-6 e CFP-10. Foram avaliados 118 pacientes com tuberculose ativa confirmados pela cultura e 213 indivíduos vacinados com BCG e com baixo risco de exposição ao *M. tuberculosis*. Após definição do ponto de corte em níveis de IFN- $\gamma \geq 0,35$  UI/ml, os autores obtiveram sensibilidade de 89% e especificidade de 98,1%.<sup>49</sup>

Ravnetal.<sup>50</sup> avaliaram o teste comercial QuantiFERON®-TB Gold em 73 pacientes suspeitos de terem a doença e em 39 indivíduos sadios vacinados com BCG e sem contato prévio com tuberculose em 2005. Dos 73 suspeitos, 48 pacientes foram diagnosticados com tuberculose ativa (35 tuberculose pulmonar e 13 tuberculose extrapulmonar) e 25 pacientes não tinham a doença. Os autores obtiveram uma sensibilidade de 83% para os pacientes com tuberculose pulmonar ativa e 92% para os pacientes com tuberculose extrapulmonar e a especificidade foi de 97% quando avaliados os indivíduos sadios.<sup>50</sup>

Estudos realizados em diferentes países, após aprovação do teste pelo Food and Drug Administration nos EUA e pela Comunidade Europeia, têm demonstrado índices de sensibilidade que variam de 62 a 86%. Em alguns estudos, a sensibilidade obtida em pacientes com tuberculose pulmonar ativa é inferior à preconizada pela OMS.<sup>51-54</sup> No Quadro 20.2 apresentamos algumas revisões e metanálises sobre a sensibilidade e especificidade dos testes QuantiFERON®-TB Gold In Tube e T-Spot® TB em pacientes com tuberculose ativa.

No Brasil, esses testes ainda não foram validados para uso na rotina clínico-laboratorial de investigação da tuberculose.<sup>40</sup>

## ► Micobacterioses

Micobacteriose é o termo genérico usado para definir as doenças causadas por micobactérias, excluindo-se o complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, que normalmente habitam o meio ambiente e podem causar doença muito similar à tuberculose em humanos. Estes organismos são conhecidos, erroneamente, como micobactérias “não classificadas”, “anônimas” e “atípicas”. São também conhecidas como “outras micobactérias que não o bacilo da tuberculose” (MOTT – sigla em inglês).<sup>17</sup>

Muitas micobactérias não tuberculosas são encontradas no solo e na água, comumente implicadas como patógenos oportunistas em pacientes com doença pulmonar crônica, imunossupressão e trauma percutâneo. A AIDS contribuiu para o aumento da incidência e morbidade das doenças associadas a essas micobactérias.

A doença pulmonar crônica que lembra a tuberculose é a apresentação clínica usual associada a estes microrganismos, embora algumas espécies sejam responsáveis por doença cutânea. Já conhecidas há vários anos, no entanto, estas micobactérias ganharam mais importância com o crescente número de pacientes imunossuprimidos, os quais passaram a viver mais tempo nessas condições. No grupo dessas micobactérias, o complexo *M. avium-intracellulare* (MAI ou MAC), *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, complexo *M. chelonae-fortuitum*, dentre outras, têm grande importância pela prevalência e morbidade.

As infecções causadas por essas micobactérias não são transmitidas de pessoa a pessoa, sendo, na maioria, casos de aquisição recente, possivelmente por via inalatória a partir de reservatórios naturais, domésticos ou nosocomiais. Existem diferenças regionais de incidência dessas micobactérias e a importância delas tem crescido, particularmente nos países desenvolvidos, nos quais o controle da tuberculose ocorreu de maneira mais efetiva.<sup>18</sup>

### ■ Identificação das micobactérias

A identificação das micobactérias pode ser realizada de maneira simples a partir da observação dos meios de cultura e provas bioquímicas. A identificação de variantes de subespécies por meio de métodos bioquímicos adicionais, fagotipagem e sorotipagem pode ser útil para informações epidemiológicas, porém de pouca relevância clínica.<sup>19</sup> A tipagem específica pode ter valor para verificar a origem de uma cepa em situações de disseminação do bacilo em grupos específicos. Nessa situação, são utilizadas as técnicas de impressão digital da micobactéria (DNA fingerprinting).

O gênero *Mycobacterium* é o único na família Mycobacteriaceae. A relação G+C (guanina + citosina) desse gênero é de 62 a 70%, similar à de outras bactérias produtoras de ácido micólico como *Nocardia* (60 a 69%), *Rhodococcus* (59 a 69%) e *Corynebacterium* (51 a 59%). Entre as micobactérias ocorre uma divisão natural quanto ao crescimento em meios de cultura: as de crescimento lento requerem mais de 7 dias para produzir colônias em meios sólidos, enquanto as de crescimento rápido requerem menos.<sup>58</sup>

As micobactérias podem apresentar crescimento filamentosos ou semelhante a micélios, que se fragmentam facilmente em elementos bacilares. No complexo MAC

**Quadro 20.2 - Sensibilidade e especificidade dos testes QuantiFERON®-TB Gold In Tube e T-Spot® TB em pacientes com tuberculose ativa.**

Referência	Número de estudos	Teste	Sensibilidade (IC)	Especificidade (IC)
48	27	QTF TB Gold IT	80% (75 a 84)	79% (75 a 82)
		T-Spot® TB	81% (78 a 84)	59% (56 a 62)
55	30	QTF TB Gold IT	70% (63 a 78)	96% (94 a 98)
		T-Spot® TB	90% (86 a 93)	93% (86 a 100)
56	17	QTF TB Gold IT	74% (69 a 78)	98% (97 a 99)
57	42	QTF TB Gold IT	81% (78 a 83)	99,2% (98 a 100)
		T-Spot® TB	87,5% (85 a 90)	86,3% (81 a 90)

QTF TB Gold IT = QuantiFERON®-TB Gold In Tube.



(*Mycobacterium avium-intracellulare*) as colônias geralmente são lisas e transparentes. *Mycobacterium kansasii* forma colônias ligeiramente rugosas e de pigmentação amarelada. A parede celular das micobactérias apresenta elevado teor de lipídios compostos principalmente de ácidos micólicos. Isso dificulta a identificação pelo emprego de corantes à base de anilinas. Embora não se corem prontamente pelo método de Gram, são considerados bacilos gram-positivos.

### Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Incluem-se nessa denominação as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum* e *M. canetti*. A espécie *Mycobacterium bovis* apresenta menor importância na prática clínica devido à pasteurização do leite; as demais espécies têm importância muito reduzida. O BCG é utilizado como cepa vacinal e origina-se a partir de várias passagens de culturas do *M. bovis*, sendo considerada atualmente uma espécie isolada.

### Complexo MAC

Consiste em duas espécies distintas: *M. avium* e *M. intracellulare*. Essas bactérias têm sido isoladas de água, solo, plantas, poeira domiciliar e outros componentes ambientais.

### Outras micobactérias

As demais micobactérias causam doenças variadas tanto no hospedeiro sadio como em pacientes imunossuprimidos. Deste grupo, exclui-se a hanseníase, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*. São bacilos álcool-acidorresistentes que se assemelham morfológicamente ao bacilo da tuberculose, porém dele se distinguem por uma série de caracteres, como cromogenia, incapacidade de produzir o fator corda e de fixar o corante vermelho neutro, incapacidade de vegetar a 30°C e a patogenicidade para a cobaia.

As micobactérias foram classificadas por Timpe e Runyon (1954, apud Youmans, 1963), em quatro grupos:<sup>58</sup>

- **Fotocromogênicas:** apresentam crescimento lento em meio de Lowenstein-Jensen, produzem pigmento amarelo-alaranjado e crescem somente em culturas expostas à luz. *Mycobacterium kansasii*, também conhecido por bacilo amarelo, é o principal representante desse grupo
- **Escotocromogênicas:** semelhantes às cromogênicas, porém capazes de produzir pigmento amarelo-alaranjado mesmo na obscuridade. São causadoras de adenite cervical em crianças. *Mycobacterium marinum* está compreendido neste grupo
- **Acromogênicas de crescimento lento:** conhecidas por cepas Batley, provocam doença pulmonar cavitária, semelhantes à tuberculose
- **De crescimento rápido:** podem produzir lesões de pele e de linfonodos. Nesse grupo, incluem-se *M. fortuitum* e *M. chelonae*, que se desenvolvem bem em ágar MacConkey e em caldo simples.

A classificação de Timpe e Runyon, juntamente com as provas de crescimento quando há agentes inibidores, permite constituir as identificações preliminares antes das demais provas bioquímicas para identificação das espécies. O Quadro 20.3 resume as principais características para diferenciação das micobactérias.

**Quadro 20.3 - Provas bioquímicas indicadas para a identificação das micobactérias.**

Espécie (grupo)	Provas bioquímicas
Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Niacina, redução de nitrato, catalase a 68°C
Não fotocromogênicas	Redução de nitrato e telurito, catalase semiquantitativa e a 68°C, hidrólise de Tween-80
Escotocromogênicas	Redução de nitrato, hidrólise de Tween-80, urease, tolerância a NaCl 5%
Fotocromogênicas	Redução de nitrato, hidrólise de Tween-80, catalase semiquantitativa, urease
Crescimento rápido	Aril-sulfatase, redução de nitrato, captação de ferro, crescimento em ágar MacConkey

### ■ Sensibilidade das micobactérias

Na população de bacilos da tuberculose que crescem em condições ideais, um pequeno número dessas bactérias apresentará mutações genéticas que conferem resistência natural a um tipo de tuberculostático. Se um paciente recebe somente este fármaco, ele não afetará esta população mutante; com a eliminação das cepas sensíveis, as mutantes ocuparão o seu lugar determinando à falência do tratamento. Por este motivo, utiliza-se associação de quatro diferentes fármacos simultaneamente no tratamento da tuberculose, pois a chance de este bacilo ser resistente a quatro medicamentos é infinitamente menor.<sup>31</sup>

O uso de testes de sensibilidade para micobactérias vem se tornando cada vez mais importante, principalmente com a emergência mundial de bacilos multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR). A grande parte desta resistência é adquirida por tratamentos irregulares e abandono. No Brasil, 96% dos casos de resistência notificados são adquiridos, sendo que mais da metade tem um histórico de três ou mais tratamentos prévios para TB, com lesões cavitárias bilaterais em 65% dos casos, e coinfeção pelo HIV.

Atualmente, recomenda-se no Brasil o uso de teste de sensibilidade em pacientes com antecedentes de tratamento prévio independentemente do tempo decorrido; pacientes imunodeprimidos, principalmente portadores de HIV; paciente com baciloscopia positiva no final do 2º mês de tratamento; no caso de falência ao tratamento antituberculose e em investigação de populações com maior risco de albergarem cepa de *M. tuberculosis* resistente como, por exemplo, profissionais de saúde, população de rua, privados de liberdade.<sup>31</sup>

Os testes de sensibilidade disponíveis no país são o método das proporções, que utiliza meio sólido e, portanto tem seu resultado após 42 dias de incubação, e os métodos que utilizam meio líquido com resultados disponíveis após 5 a 13 dias. Os antimicobacterianos testados, em geral, são estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.

O sistema BACTEC MGIT™ é um procedimento qualitativo, que pode ser realizado a partir de culturas de *M. tuberculosis* em meios sólidos ou líquidos, para os seguintes fármacos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol (BACTEC MGIT™ SIRE). O teste tem como base o crescimento de *M. tuberculosis* em tubos contendo cada fármaco comparado ao tubo sem fármaco (controle de crescimento).<sup>31</sup> O equipamento monitora os tubos continuamente para detectar a emissão da fluorescência. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco comparada à fluorescência no tubo controle de crescimento é o que determina os resultados do teste de sensibili-



dade e é realizada automaticamente pelo equipamento. Após essa análise, o equipamento interpreta os resultados utilizando algoritmo específico e libera os resultados do teste de sensibilidade como S (sensível) ou R (resistente).

O MGIT™ 960, método totalmente automatizado e não radiométrico, passou a ser considerado padrão-ouro, pois além de demonstrar desempenho similar ao método de proporções, apresentou tempo médio de detecção de 7 dias. Em nosso meio, observou-se elevada concordância entre o desempenho do MGIT™ 960 e os três métodos até então considerados de referência para o diagnóstico de TB resistente: método de proporções, BACTEC 460, e razão da resistência. O MGIT™ 960 está validado e aprovado pela Anvisa para os fármacos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol.<sup>31</sup>

## ■ Testes moleculares

Devido ao lento crescimento de *M. tuberculosis*, mesmo em meios líquidos, diversos métodos moleculares foram desenvolvidos e muitos ainda estão em fase de avaliação por fornecerem um resultado mais rápido para detectar essa micobactéria e a resistência do microrganismo aos fármacos utilizados no tratamento, como rifampicina e isoniazida.<sup>59</sup>

### Teste para amplificação de ácidos nucleicos

Praticamente todas as técnicas fundamentadas na amplificação de ácidos nucleicos utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de sequências de DNA ou RNA específicas do complexo *M. tuberculosis*.

As reações de PCR *in house* utilizam diferentes sequências-alvo para o diagnóstico da tuberculose; a sequência mais utilizada é a inserção IS6110; a sensibilidade geral encontrada em amostras de escarro variou de 84 a 100% e a especificidade de 83 a 100%. Índices inferiores de sensibilidade e especificidade foram observados em amostras não respiratórias.<sup>31,59</sup>

Os primeiros testes moleculares comerciais desenvolvidos e ainda disponíveis no mercado para o diagnóstico da tuberculose, com aprovação da FDA, são Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test® (Amplicor) (Roche Diagnostic Systems Inc, NJ) e o Amplified MTD® (Mycobacterium tuberculosis Direct) Test (Gen-Probe Inc., San Diego, CA).

O teste Amplicor MTB® utilizando *primers* gênero-específico amplifica um segmento do gene 16S rRNA; após hibridização com sondas, o produto é detectado em microplaca por reação colorimétrica. Uma versão automatizada do teste, COBAS Amplicor MTB test® associado à plataforma COBAS analyzer (Roche Diagnostics, Suíça) permitiu a automação do processo de amplificação e detecção em um único sistema.

Muitos estudos têm avaliado Amplicor MTB test® para a detecção de *M. tuberculosis* em amostras respiratórias e em amostras não respiratórias; a sensibilidade geral obtida variou de 90 a 100% em amostras de escarro com baciloscopia positiva e de 50 a 95,9% em amostras de escarro com baciloscopia negativa. Para espécimes clínicos extrapulmonares, a sensibilidade foi consistentemente inferior às amostras respiratórias e a especificidade geral variou de 91,3 a 100%.<sup>59</sup>

O Amplified MTD®, por outro lado, utiliza metodologia de amplificação isotérmica de transcritos 16S ribossômicos, detectados por hibridização com sondas de DNA específicas do complexo *M. tuberculosis* marcadas com éster de acridina. Aprovado pela FDA para amostras com baciloscopia positiva e negativa, o teste apresentou sensibilidade geral de 77 a 100%, sendo que em amostras com baciloscopia positiva o índice de

sensibilidade variou de 90 a 100% e em amostras com baciloscopia negativa os valores obtidos foram de 63 a 100%.

Existem outros sistemas para a detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas, como o BDProbeTec™ MTB test (Becton Dickinson, Sparks, MD). Este teste utiliza tecnologia de amplificação por deslocamento de cadeia (*strand displacement amplification*) para a amplificação e detecção simultânea de DNA do complexo *M. tuberculosis*; utiliza *primers* para amplificação das sequências-alvo IS6110 e 16S rRNA e uma sonda de detecção com marcação fluorescente.<sup>59,62</sup>

Em estudos, esta metodologia apresentou sensibilidade de 100% em amostras com baciloscopia positiva e de 92 a 100% em amostras com baciloscopia negativa, com especificidade geral de 96 a 100%. O principal fator limitante dessa metodologia é o preparo da amostra, que é em torno de 2 h.

Uma nova versão do teste foi lançada – BDProbe Tec™ ET –, a qual incluiu um controle interno para detectar inibidores e é avaliada em amostras respiratórias e em amostras extrapulmonares. Como mencionado anteriormente, este teste apresentou alta sensibilidade e especificidade para amostras respiratórias com baciloscopia positiva.<sup>60</sup>

### Amplificação isotérmica

A LAMP (*loop mediated isothermal amplification*) é fundamentada na amplificação de sequências de DNA, mas não requer ciclos de temperatura, como na PCR; a síntese de DNA se completa em uma só temperatura (reação isotérmica). A identificação de uma reação positiva pode ser observada mediante a turbidez no tubo de reação, portanto o aumento da turbidez no tubo correlaciona-se com a quantidade de DNA sintetizado. Todo o procedimento é realizado a 63°C e, com exceção de um banho-maria ou seco, nenhum outro equipamento é necessário.<sup>59,61,62</sup>

Boehme *et al.*<sup>61</sup> mostraram que o teste apresentou sensibilidade de 97,7% em amostras de escarro com baciloscopia e cultura positivas e de 48,8% em amostras com baciloscopia negativa e cultura positiva; a especificidade encontrada foi de 99%. Apesar de o desempenho do teste estar longe do ideal para amostras com baciloscopia negativa, esse tipo de metodologia apresenta características que favorecem a utilização em áreas de poucos recursos e infraestrutura.<sup>61</sup> No Quadro 20.4 apresentamos os parâmetros de sensibilidade e especificidade dos diferentes testes moleculares no diagnóstico da tuberculose.

### PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real também foi proposta como um teste rápido para a detecção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Esta reação baseia-se na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que ocorre a hibridização dos ácidos nucleicos amplificados com sondas fluorescentes do segmento de DNA de interesse. O sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado no tubo. Para a detecção de resistência à rifampicina e à isoniazida, diversos sistemas de detecção foram usados, como TaqMan, SyberGreen, Molecular Beacons, entre outros.<sup>59,62,63,69</sup>

A principal vantagem da PCR em tempo real é a duração do processo. Os resultados são obtidos em aproximadamente 1,5 a 2 h após a extração do DNA; há baixo risco de contaminação, pois a reação ocorre em um único tubo. As desvantagens são a necessidade de equipamentos e reagentes caros e profissionais experientes.

O Xpert® MTB/RIF Assay (Cepheid Sunnyvale, CA, EUA) baseia-se na PCR em tempo real. Neste aparelho, o espécime clínico (escarro) é colocado em um recipiente (cartucho) que



**Quadro 20.4 • Parâmetros de sensibilidade e especificidade dos testes moleculares para o diagnóstico da tuberculose.<sup>59</sup>**

Testes moleculares	TB pulmonar com baciloscopia positiva		TB pulmonar com baciloscopia negativa		TB extrapulmonar	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Amplicor	97	> 95	40 a 73	> 95	27 a 98	> 95
AMTD	92 a 100	> 95	40 a 93	> 95	93	> 95
BDProbe Tec	90 a 100	92	33 a 100	83 a 97	76	> 90
PCR em tempo real	78	100	78	100	80	100
LAMP	97,7	99	48,8	99	ND	ND

S = sensibilidade; E = especificidade; ND = não determinado.

contém todos os reagentes para extração, amplificação de ácidos nucleicos e identificação de sequências do gene *rpoB*. Os resultados podem ser obtidos em menos de duas horas. Em um estudo de campo, o teste apresentou sensibilidade de 98,2% para identificação de isolados em amostras com baciloscopia e cultura positiva, e 72,5% para a identificação de isolados em amostras com baciloscopia negativa e cultura positiva; a especificidade encontrada foi de 99,2%.

A sensibilidade do teste aumentou para 90,2% quando foram analisadas três amostras de escarro, colhidas em dias diferentes. Neste mesmo estudo, o teste apresentou uma sensibilidade de 97,6% para a detecção de cepas resistentes à rifampicina e especificidade de 98,1%. As desvantagens deste teste são não detectar resistência à isoniazida, custo, necessidade de infraestrutura adequada e pessoal treinado.<sup>64,70</sup> Após o apoio da OMS para a utilização deste teste, diversos países estão avaliando o Xpert® MTB/RIF Assay na rotina laboratorial para diagnóstico a tuberculose e para a detecção de cepas resistentes à rifampicina. No Brasil, estão sendo conduzidos estudos para avaliar a acurácia do teste.<sup>40</sup>

### Testes moleculares para identificação das micobactérias

A identificação das micobactérias tradicionalmente é realizada por testes bioquímicos e características fenotípicas, tais como tempo de crescimento, coloração e morfologia das colônias. Esses métodos são de simples realização e não requerem equipamentos sofisticados, entretanto, são trabalhosos e demorados.

Os métodos moleculares também permitem a identificação mais rápida das micobactérias que os métodos tradicionais, especialmente do complexo *M. tuberculosis*. O primeiro teste comercial foi o AccuProbe® (Gen-Probe Inc.), com base em sondas de DNA espécie-específicas que hibridizam com rRNA para a identificação de micobactérias de importância clínica, incluindo o complexo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae*. Os resultados são obtidos em aproximadamente 2 h a partir de amostras com cultura positiva. Este teste foi amplamente avaliado em diferentes locais, apresentando sensibilidade e especificidade superiores a 90%.<sup>59,62</sup>

Recentemente, vários testes moleculares para a identificação do complexo *M. tuberculosis* foram lançados no mercado, como o INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium) e o GenoType® MTBC e o GenoType® *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Nehren, Germany), ambos para serem usados em amostras com cultura positiva.

O INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 permite detectar e identificar o gênero *Mycobacterium* e 16 diferentes espécies de micobactérias. Fundamenta-se na diferença de nucleotídeos nos genes 16S–23S rRNA da micobactéria. Após ampli-

cação por PCR e desnaturação, faz-se a hibridização dos amplicons com as sondas imobilizadas em membrana específica, sob condições rigidamente controladas. Esse teste pode ser feito a partir de culturas realizadas em meio sólido ou líquido. Entre as micobactérias identificadas no INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 podemos citar: complexo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* e *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoeense*, *M. haemophilum*, o complexo *M. chelonae*, o complexo *M. fortuitum* e *M. smegmatis*. O teste foi avaliado com diversas espécies de micobactérias e apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 94%.<sup>65</sup>

O GenoType® MTBC e o GenoType® *Mycobacterium* também se baseiam no princípio de hibridização de fase sólida reversa e permitem diferenciar as espécies que fazem parte do complexo *M. tuberculosis* e outras 35 espécies de micobactérias, respectivamente. O GenoType® MTBC fundamenta-se em sequências específicas do gene 23S rRNA para o complexo *M. tuberculosis*, associado à análise de polimorfismos na sequência *gyrB* e na região de deleção RD1 para identificação de *M. tuberculosis*.

O GenoType® *Mycobacterium* baseia-se no gene 23S rRNA para identificação das espécies. Após amplificação por PCR, a hibridização é realizada com oligonucleotídeos imobilizados em membrana específica e a interpretação dos resultados parte da combinação de bandas que aparecem ao término da reação. Para a realização desses testes são necessários termocicladores e áreas separadas para as diferentes etapas da reação de PCR.<sup>59</sup>

Diversos são os alvos utilizados para a identificação de *M. tuberculosis*, por técnicas *in house* como 16S rRNA, 23S rRNA; regiões conservadas e hipervariáveis também são propostas como alvo para identificação como, por exemplo, gene que codifica proteína 65 kDa, *rpoB*, *sodA* e *recA*. Entretanto, a acurácia desses testes têm se mostrado bastante heterogênea.<sup>40</sup>

### Testes moleculares para a detecção de cepas resistentes a fármacos

Como mencionado anteriormente, a detecção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos tem como base o método das proporções, comparando o crescimento da micobactéria em tubo contendo os fármacos com o tubo controle (sem adição de fármacos) em meio Lowenstein-Jensen ou Middlebrook. São necessárias de 3 a 6 semanas para a obtenção do resultado.<sup>62</sup> A utilização de meios líquidos na cultura reduziu o tempo para a obtenção dos resultados de sensibilidade aos fármacos, porém, com a emergência de formas graves da tuberculose, principalmente as relacionadas com cepas extensivamente resistentes (TB XDR), faz-se necessário que métodos mais rápidos sejam melhorados, ou desenvolvidos e



aplicados na prática clínica. Com o propósito de detectar rapidamente as cepas resistentes a fármacos, diversos testes moleculares foram propostos nos últimos anos.

### Testes de hibridização em fase sólida

Esta metodologia envolve diversos passos que incluem desde a extração de DNA da micobactéria, isolada em meio de cultura ou diretamente de espécimes clínicos, amplificação de sequências de ácidos nucleicos por PCR, hibridização do produto amplificado marcado com as sondas imobilizadas em membranas e a reação colorimétrica que permite a visualização de linhas na membrana, local em que as sondas estavam imobilizadas – teste denominado de Line Probe Assay.<sup>66</sup>

Estão disponíveis comercialmente dois testes com base neste princípio para a detecção rápida de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos: Line Probe Assay (INNO-LiPA Rif TB<sup>®</sup> Assay, Innogenetics NV) para a detecção de cepas resistentes à rifampicina (mutações gene *rpoB*) e o GenoType<sup>®</sup> MTBDRPlus (Hain Lifescience) para a detecção simultânea de cepas resistentes à rifampicina e à isoniazida.<sup>59,62</sup>

Em revisão sistemática realizada sobre o desempenho do teste INNO-LiPA Rif TB<sup>®</sup> Assay para a detecção de resistência de cepas à rifampicina isoladas em meio de cultura, o teste apresentou sensibilidade superior a 95% e especificidade de 100%. Em quatro estudos que avaliaram o desempenho do teste em espécimes clínicos, a especificidade encontrada foi de 100% e a sensibilidade variou de 80 a 100%.<sup>66</sup>

Outro estudo realizado em 2006 verificou a utilidade do INNO-LiPA Rif TB<sup>®</sup> Assay para a detecção de cepas resistentes em 420 amostras de escarro de pacientes provenientes de diferentes países. O teste apresentou uma concordância de 99,6% com os resultados obtidos pela cultura.

O segundo teste disponível comercialmente é o GenoType<sup>®</sup> MTBDR (Hain Lifescience). Essa primeira versão do teste apresentou sensibilidade de 90 a 95% para a detecção de resistência à rifampicina e índices inferiores para a detecção de resistência à isoniazida.<sup>67,68</sup> Essa primeira versão detecta mutações nos genes *katG* e *rpoG*.

A versão modificada do teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRPlus, além de detectar mutações nos genes *katG* e *rpoG*, incluiu também a detecção de mutações no gene *inhA*. Embora alguns estudos mostrem melhora no desempenho do teste, outros ainda mencionam que a sensibilidade para a detecção de resistência à isoniazida precisa ser aprimorada.<sup>69,70</sup>

Em estudo realizado em 2008, o GenoType<sup>®</sup> MTBDRPlus foi implantado em laboratório público de grande porte para a triagem rápida de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (TB MDR). A avaliação mostrou que 97% dos resultados de amostras com baciloscopia positiva estavam disponíveis dentro de 1 a 2 dias. Os índices de sensibilidade e especificidade para a detecção de resistência à rifampicina foram de 98,9% e 99,4%, respectivamente; para a resistência à isoniazida, a sensibilidade encontrada foi de 94,2% e a especificidade de 99,7%. Para a detecção de resistência simultânea à rifampicina e à isoniazida, os índices de sensibilidade e especificidade encontrados foram de 98,8 e 100%, respectivamente, quando comparados aos resultados dos testes tradicionais de sensibilidade a fármacos.

Recentemente, foi lançado o GenoType<sup>®</sup> MTBDRsI para a detecção de resistência a fluoroquinolonas, canamicina, ampicacina e capreomicina. Apesar de dois estudos terem apresentado resultados promissores para a detecção de resistência aos fármacos de segunda linha de tratamento da tuberculose, o

teste apresentou resultados variáveis. Portanto, mais estudos são necessários para avaliação do teste e para verificar a sua real utilidade na prática clínica.<sup>62</sup>

## Referências bibliográficas

- Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P *et al.* Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395.
- Ducati RG, Basso LA, Santos DS. Micobactérias. In: Trabulsi IR, Alterthum F. *Microbiologia*, 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
- Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1997; 45: 115-131.
- Kritski AL, Conde MB, Muzy de Souza GR. A bacteriologia da tuberculose. In: *Tuberculose do ambulatório à enfermaria*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 21-6.
- Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003 Nov; 1(2): 97-105.
- Kaufmann SHE. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(Suppl): 50-56.
- WHO – World Health Organization. Tuberculosis. WHO fact sheet no. 104 revised march 2006. Available from: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104)
- WHO – World Health Organization. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. WHO 2010. Disponível em <http://www.who.org>.
- WHO – World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2010. Disponível em <http://www.who.org>.
- WHO – World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3 Disponível em <http://www.who.org>.
- Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico Epidemiológico 2009; 9(2): 1-4.
- Lemos ACM. Coinfecção tuberculose/HIV. *J Bras Pneumol* 2008; 34(10): 753-755.
- Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multidrug resistant tuberculosis? A systematic review. *PLoS One*. 2009; 4(5): e5561.
- WHO – World Health Organization. 2004. Global burden of disease and risk factors. Disponível em <http://www.who.org>.
- Grange JM. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. In: Davies PDO. *Clinical Tuberculosis*. Second Edition. Chapman & Hall, London, 1998. p. 129-152.
- Jagirdar J, Zagazg D. Pathology and Insights into Pathogenesis of Tuberculosis. In: Rom WN, Garay S. *Tuberculosis*. First Edition. Little, Brown and Company, USA. 1996. p. 467-482.
- Banks J, Campbell IA. Environmental mycobacteria. In: Davies PDO. *Clinical Tuberculosis*. Second Edition. Chapman & Hall, London, 1998. p. 521-533.
- Shinners D, Yeager Jr. H. Clinical Syndromes and Diagnosis: Overview. In: Schlossberg D. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. W.B. Saunders Company, USA, 1999. p. 341-350.
- Jenkins PA. The microbiology of tuberculosis. In: Davies PDO. *Clinical Tuberculosis*. Second Edition. Chapman & Hall, London, 1998. p. 69-79.
- Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4(Suppl 12): 182-188.
- Ganguly NK. What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part I: techniques for diagnosis of tuberculosis. *ICMR Bulletin* 2002; 32 (8).
- Cooksey RC. Recent advances in laboratory procedures for pathogenic micobactéria. *Clin Lab Med* 2003; 23: 801-821.
- Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D *et al.* Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations and possibilities. *J Clin Lab Anal* 2003; 17: 155-163.
- II Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J Brasil Pneumol* 2004; 30 (Suppl1): 4-23.
- API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. *JAPI* 2006; 54: 219-234.
- WHO – World Health Organization. Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential/TDR, FIND SA. 2006. Disponível em <http://www.who.org>
- Doherty, T. M. Clinical Diagnosis of *M. tuberculosis* infection. In: Kaufman SHE, van Helden P. *Handbook of Tuberculosis: Clinics, Diagnostics, Therapy and Epidemiology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. p. 63-87.
- Hanna BA. Diagnosis of Tuberculosis by Microbiology Techniques. In: Rom WN, Garay S. *Tuberculosis*. First Edition. Little, Brown and Company, USA. 1996. p. 149-159.



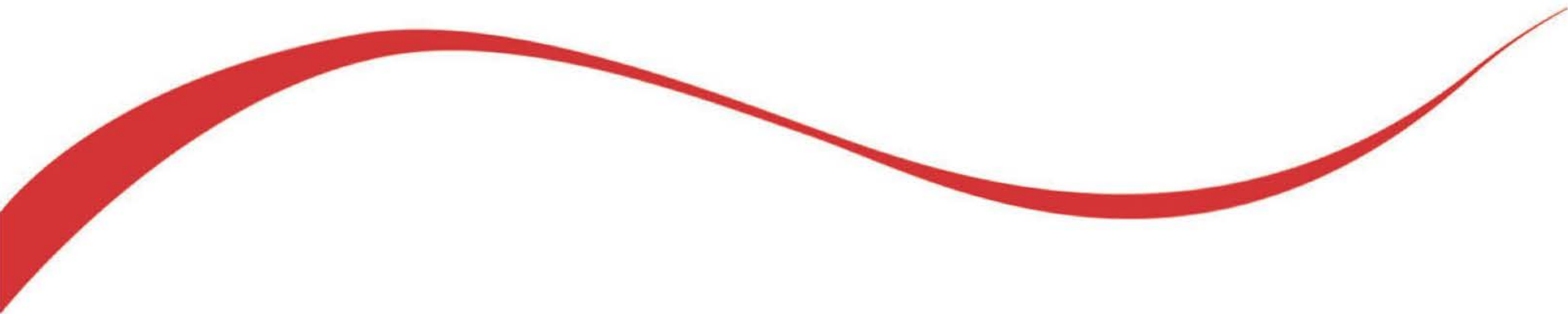
29. Palomino JC, Martin A, Von Groll A, Portaels F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Meth 2008; 75: 161-166.
30. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. Curr Opin Infect Dis 2009 Apr; 22(2): 174-182.
31. Ministério da Saúde – Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2010.
32. Caws M, Dang TM, Torok E *et al*. Evaluation of the MODS culture technique for the diagnosis of tuberculous meningitis. PLoS One 2007; 2(11): e1173.
33. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2008; 62(1): 56-64.
34. Arias M, Mello FC, Pavon A *et al*. The microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of tuberculosis and tuberculosis drug resistance: results from a multicenter study. Clin Infect Dis 2007; 44(5): 674-680.
35. Liang QL, Shi HZ, Wang K, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: A meta-analysis. Respir Med 2008; 102(5): 744-754.
36. Neves DD, Dias RM, Cunha AJLA, Preza PCA. What is the Probability of a patient presenting a pleural effusion due to tuberculosis? Braz J Infect Dis 2004; 8: 311-318.
37. Morisson P, Neves DD. Evaluation of adenosine deaminase in the diagnosis of pleural tuberculosis: a Brazilian meta-analysis. J Bras Pneumol 2008, Apr; 34(4): 217-224.
38. Steingart KR, Dendukuri N, Henry M *et al*. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-Analysis. Clin Vaccine Immunol 2009; 16 (2): 260-276.
39. Flores LL, Steingart KR, Dendukuri N *et al*. Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis. Clin Vaccine Immunol 2011; 18(10): 1616-1627.
40. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. J Bras Pneumol 2009; 35(10): 1018-1048.
41. Lordi GM, Reichman LB. Tuberculin Skin Test. In: Schlossberg D. Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. W.B. Saunders Company, USA, 1999. p. 65-70.
42. Skjöt RV, Oettinger T, Rosenkrands J *et al*. Comparative evaluation of low molecular mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the esat-6 family as immunodominant T-cell antigens. Infect Immun 2000; 68: 214-220.
43. Arend SM, Andersen P, Van Meijgaarden KE *et al*. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. J Infect Dis 2000; 181: 1850-1854.
44. Smith J. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 463-496.
45. Pai M, Riley LW, Colford JMJ. Interferon- assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 2004; 4: 761-766.
46. Van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 155-160.
47. European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011.
48. Sester M, Sotgiu G, Lange C *et al*. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2011; 37(1): 100-111.
49. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F *et al*. Specific detection of tuberculosis infection an interferon- $\gamma$ -based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170: 59-64.
50. Ravn P, Munk ME, Andersen AB *et al*. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 491-496.
51. Lee JY, Choi HJ, Park IN *et al*. Comparison of two commercial interferon- $\gamma$  assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. Eur Respir J 2006; 28: 24-30.
52. Ferrara G, Losi M, D'Amico R *et al*. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: prospective study. Lancet 2006; 367: 1328-1334.
53. Tsiouris SJ, Coetzee D, Toro PL, Austin J, Stein Z, El-Sadr W. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 2006; 44: 2844-2850.
54. Dewan PK, Grinsdale J, Kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon- $\gamma$  release assay for detection of active tuberculosis. Clin Infect Dis 2007; 44: 69-73.
55. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic Review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med 2008; 149: 177-184.
56. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. Respirology 2010; 15: 220-240.
57. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon- $\gamma$  release assays for detecting active TB. Chest 2010; 137(4): 952-968.
58. Youmans GP. The pathogenic "Atypical" mycobacteria. Annu Rev Microbiol 1963; 17: 473-494.
59. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56(2): 103-111.
60. Rusch-Gerdes S, Richter E. Clinical evaluation of the semiautomated BD-ProbeTec ET System for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 265-270.
61. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G *et al*. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. J Clin Microbiol 2007; 45: 1936-1940.
62. Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and drug resistance. Clin Infect Dis 2011; 52(11): 1350-1355.
63. Varma-Basil M, El-Hajj H, Colangeli R *et al*. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India and Mexico by a molecular beacon assay. J Clin Microbiol 2004; 42: 5512-5516.
64. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D *et al*. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010; 363: 1005-1015.
65. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. J Clin Microbiol 2003; 41: 4418-4420.
66. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2005; 5: 62.
67. Miotto P, Piana F, Penati V *et al*. Use of Genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol 2006; 44: 2485-2491.
68. Bang D, Andersen AB, Thomsen VO. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. J Clin Microbiol 2006; 44: 2605-2608.
69. Vijdea R, Stegger M, Sosnovskaja A *et al*. Multidrug resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 1079-1086.
70. Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C *et al*. GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. J Clin Microbiol 2008; 46: 3660-3667.







## Seção 4 | Protozoários





- Capítulo 21 | Amebíase, 257
- Capítulo 22 | Doença de Chagas, 268
- Capítulo 23 | Leishmanioses, 277
- Capítulo 24 | Malária, 283
- Capítulo 25 | Protozooses Emergentes, 300
- Capítulo 26 | Toxoplasmose, 304



## Capítulo 21

---

# Amebíase

*Jerolino Lopes Aquino*

- Introdução, 258
- Diagnóstico laboratorial, 259
- Diferenciação das amebas parasitos do trato intestinal, 265
- Conclusão, 266
- Bibliografia, 267



## ► Introdução

Amebíase é definida como a infecção pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, do filo Sarcomastigota, classe Sarcodina, ordem Amoebida, gênero *Entamoeba*, apresentando ou não manifestações clínicas. Os protozoários da classe Sarcodina são organismos que se movem e incorporam alimentos através de pseudópodes. Existem outros membros dessa classe que se encontram no trato gastrointestinal do homem, mas que não são considerados patogênicos, como *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba poleck*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschli* e *Entamoeba dispar*. Testes bioquímicos, imunoenzimáticos, imunológicos e genéticos demonstraram que em mais de 90% das amebíases assintomáticas trata-se da *Entamoeba dispar*, o que vale ressaltar que a concepção moderna deva ser a dualista, definindo a *E. dispar* para espécie não patogênica.

A amebíase é uma doença com distribuição geográfica mundial, com predominância nas regiões tropicais e subdesenvolvidas, onde as condições de higiene e socioeconômicas são precárias. Calcula-se que de 5 a 50% da população mundial tenham *E. histolytica* no lúmen intestinal, variando segundo as regiões. Cerca de 10% exibem sintomas clínicos, que vão desde os não específicos de doença gastrointestinal até disenteria, colite e ameboma. De 2 a 20% dos indivíduos sintomáticos progridem para invasão extraintestinal com formação de abscesso, especialmente do fígado, com alto índice de letalidade. Estima-se que entre 40.000 e 110.000 óbitos anualmente se devam à amebíase, principalmente no Oriente Médio, na África e na Índia, o que classificaria esta protozoose como a segunda causa de mortalidade, dentre as parasitoses humanas, perdendo apenas para a malária.

No Brasil, segundo levantamento efetuado em diversas regiões, a prevalência de *E. histolytica* varia de 2 a 50%, sendo alta em algumas cidades como Manaus, Belém, João Pessoa e Porto Alegre. Nos estados da Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, a incidência da amebíase é relativamente alta, enquanto no estado de São Paulo os inquéritos realizados mostram uma incidência que varia de 10 a 20%.

Com base em exames parasitológicos de fezes, efetuados em coletividades diversas, ficou demonstrada a disseminação de *E. histolytica* em todos os países. Contudo, de acordo com Neves (2003), um número maior de portadores sintomáticos é encontrado em países como México, Caribe, Colômbia, Peru, Equador, África do Sul, Egito, Marrocos, Iraque, Índia, Bangladesh, Tailândia, Vietnã, além dos EUA.

No caso específico dos EUA, cerca de 3.500 casos de amebíase são notificados por ano aos Centros de Controle de Doenças. Grupos reconhecidamente de alto risco incluem: viajantes, imigrantes, trabalhadores migrantes, pessoas imunocomprometidas, internos em institutos para doentes mentais e homossexuais sexualmente ativos, predominando, dentre os homossexuais masculinos, cepa não patogênica do organismo.

Alguns países têm uma incidência elevada de amebíase extraintestinal, como a Índia, o México, a Tailândia e vários países do Oriente Médio e do norte da África.

A transmissão de *E. histolytica* se dá por meio da ingestão de alimentos e água contaminados com cistos tetranucleados, ocorrendo o desencistamento no íleo, com formação de oito amebas metacísticas, que migram para o ceco, onde formam colônia. Moscas e baratas contribuem para sua transmissão em áreas endêmicas.

A transmissão direta de *E. histolytica* de pessoa a pessoa é muito frequente em hospitais para doentes mentais, asilos e presídios, onde as condições de higiene são precárias. *E. histolytica* pode parasitar homens de qualquer idade, mas sua frequência é menor nos primeiros anos de vida. Não existe diferença da prevalência de *E. histolytica* quanto ao sexo, não obstante alguns trabalhos relatem que a mulher seja um pouco menos infectada que o homem; todas as etnias são sensíveis à infecção.

Medidas que visam diminuir consideravelmente a prevalência da amebíase são: educação sanitária, melhora das condições socioeconômicas e culturais, ampliação da rede de água tratada e de esgoto, coleta de lixo constante de toda a população, combate aos insetos veiculadores, tratamento adequado dos doentes e portadores assintomáticos.

De acordo com o Comitê de Peritos da Organização Mundial da Saúde, são dois os principais grupos de formas clínicas de amebíase: assintomáticas e sintomáticas.

### ▪ Forma assintomática intestinal

Cerca de 90% dos indivíduos infectados por *Entamoeba histolytica* exibem infecção assintomática e constituem um vasto reservatório do parasito. Porém, alguns desses indivíduos podem tornar-se sintomáticos desde que o parasito avirulento e comensal adquira virulência e venha a invadir a mucosa intestinal. Logo, entende-se que indivíduos com a forma assintomática não possam receber a denominação de portadores sadios e, uma vez encontrados cistos nas fezes, há necessidade de tratamento.

### ▪ Formas sintomáticas

#### *Amebíase intestinal*

São duas as formas principais, por sua importância clínica: disenteria amebiana, mais rara, e colite não disentérica, mais frequente e responsável por grande número de pacientes infectados. Além dessas formas, têm-se também ameboma e apendicite amebica.

#### *Disenteria amebiana*

Manifesta-se com um quadro de disenteria aguda, com presença de muco e sangue nas fezes que, dependendo da gravidade do caso, pode levar o paciente a mais de 28 evacuações por dia, enquanto nos casos menos graves o número de evacuações diárias é de 6 a 10. O paciente apresenta dores abdominais, náuseas, vômitos e tenesmo, com uma evolução que pode assemelhar-se à da disenteria bacilar.

As características das fezes merecem atenção na diferenciação da disenteria bacteriana. As fezes amebianas típicas são ácidas, pH 5,5 a 6,0, com pouco exsudato celular, algumas ou numerosas hemácias degeneradas e, na sua maioria, aglutinadas, algumas células epiteliais, neutrófilos, numerosos resíduos picnóticos e poucas bactérias.

Já na disenteria bacilar, as fezes típicas são diarreicas e alcalinas, com pouco material fecal e abundante exsudato celular; as hemácias geralmente são íntegras, observam-se numerosos neutrófilos polimorfonucleares e células epiteliais, alguns resíduos picnóticos, muitas bactérias e macrófagos com características morfológicas semelhantes à *Entamoeba histolytica* que, em algumas ocasiões, emitem pseudópodes e fagocitam hemácias.



Não se deve, porém, esquecer de que as duas disenterias podem coexistir, amebianas e bacilar, recomendando-se, nesse caso, fazer uma lâmina direta corada pelo azul de metileno a fim de diferenciar leucócitos de amebas.

### Colite não disentérica

Esta forma manifesta-se com evacuações diarreicas ou não. As fezes são pastosas ou semilíquidas, contendo muco e pouco sangue, e o portador faz até cinco deposições por dia, ocorrendo frequentemente períodos de funcionamento intestinal normal com alternância do período diarreico. O paciente sente desconforto abdominal, com cólicas localizadas e flatulência, podendo ocorrer período de constipação intestinal com dores abdominais em razão da retenção dos materiais fecais, junto com intensa hipertonia intestinal. Não sendo tratado, o paciente volta a apresentar os sintomas de disenteria amebiana aguda, seguindo-se outro período de latência e nova recaída disentérica. Essa sequência de acontecimentos constitui a forma crônica da colite amebiana.

### Amebíase extraintestinal

- Amebíase hepática aguda não supurativa e necrose coliquativa
- Amebíase cutânea
- Amebíase de outros órgãos: pulmão, cérebro, baço etc.

## ► Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de *E. histolytica* é feito tradicionalmente por meio do exame parasitológico das fezes, em que geralmente se encontram cistos em fezes consistentes e trofozoítos em fezes diarreicas ou semidiarreicas.

O exame de uma única amostra de fezes muitas vezes não leva a um diagnóstico definitivo, uma vez que o número de cistos liberados diariamente varia muito nos portadores. Trabalhos realizados concluem que, quando um portador elimina 100.000 cistos por dia, a probabilidade de diagnóstico mostra ser apenas de 50%, aumentando esse índice para 82% quando três amostras são analisadas em um período de 8 dias.

Nas fezes diarreicas, o tempo decorrente da coleta à realização do exame tem sido um fator que dificulta o diagnóstico em razão da natureza frágil das amebas.

A inexperiência técnica tem registrado erros no diagnóstico de *E. histolytica*, já que resultados falso-negativos têm sido observados quando parasitos encontrados nas fezes não são identificados, e resultados falso-positivos ocorrem quando leucócitos, outras amebas, células sanguíneas ou *Blastocystis* são identificados erroneamente como *E. histolytica*.

- Aspectos que devem ser considerados no auxílio do diagnóstico de *Entamoeba histolytica*

### Tipo de recipiente utilizado para coleta

Preferencialmente, devem-se coletar as fezes diretamente em frasco plástico, de boca larga, rosqueado e fabricado especialmente para transporte de amostras fecais, ou frasco de vidro bem lavado, isento de qualquer contaminação, dando preferência à porção final de evacuação, devendo-se rejeitar

material contaminado com urina, que pode destruir as formas vivas da amostra. Da mesma maneira, fezes coletadas de vasos sanitários não servem, pois, além de isso interferir na estrutura dos trofozoítos, o paciente corre o risco de contaminação por bactérias, vírus e outros parasitos.

### Volume

A quantidade de amostra para análise deverá ser em torno de 30 g, pois pequenas quantidades de fezes poderão ser insuficientes para um diagnóstico seguro.

### Tempo entre a coleta e a análise

Suspeitando-se de amebíase, as amostras deverão ser coletadas e analisadas o mais brevemente possível. O laboratório deverá passar essa orientação ao paciente, uma vez que os trofozoítos têm um período de vida muito curto no meio externo, entre 15 e 30 min. Caso não seja possível entregar a amostra nesse período, deverá ser preservada em fixadores como: Schaudinn, APV (álcool polivinílico) e SAF (acetato de sódio/ácido acético/formaldeído).

### Medicamentos

Certos produtos químicos podem tornar as fezes não recomendadas para análise, como o uso de antibióticos que afetem a flora intestinal normal. Da mesma maneira, contrastes radiológicos que contenham bário ou bismuto interferem nas amostras, pois partículas desses produtos podem destruir as amebas, além de vaselinas, óleos minerais e anti-diarreicos, que prejudicam sua identificação. Quanto à coleta das fezes, recomenda-se que seja feita 10 dias após o uso do contraste.

### Números de amostras

Cerca de 90% das infecções por *E. histolytica* são assintomáticas, e o diagnóstico é em geral realizado por meio da identificação dos cistos, uma vez que as formas móveis nesta fase são eliminadas com menor frequência. Portanto, várias coletas em dias alternados irão propiciar maior percentual de resultados positivos.

### Uso de laxantes

Quando se suspeita de amebíase e o paciente está evacuando fezes semidiarreicas ou consistentes, e se vários exames são realizados com resultados negativos, torna-se necessário administrar ao paciente um laxante a fim de estabelecer e confirmar o diagnóstico. Os laxantes salinos, como o fosfato de sódio e o sulfato de sódio tamponado, são os mais recomendados, uma vez que causam menos danos às estruturas morfológicas das amebas.

Amostras coletadas após o efeito do laxante devem ser enviadas o mais brevemente possível ao laboratório. Caso contrário, devem ser preservadas nos fixadores de APV ou Schaudinn.

### Observação macroscópica das fezes

Fazer uma análise macroscópica das fezes é muito importante não só para auxiliar no diagnóstico de *E. histolytica*, como para observação de parasitos adultos ou proglotes de *Taenia* sp. A consistência das fezes, a cor e o aspecto líquido com muco e sangue deverão ser observados e anotados na ficha do paciente. Essas fezes terão preferência para análise imediata, dado que os trofozoítos de *E. histolytica* são frequentemente encontrados neste tipo de amostra e com maior predominância no muco.



## ▪ Pesquisa direta do parasito nas fezes

### Método direto a fresco com salina

A pesquisa direta a fresco é uma técnica muito simples e de fácil execução, que tem por objetivo pesquisar formas móveis de ameba nas fezes. A técnica consiste em colocar uma pequena porção das fezes misturada com salina entre a lâmina e a lamínula, dando preferência às partes mucossanguinolentas, quando presentes, e observar ao microscópio em aumento de 400×, em busca de formas móveis de amebas no material examinado, bem como tipo de movimento apresentado pelo microrganismo. Embora simples, esta técnica requer um microscopista experiente que possa distinguir os diferentes tipos de amebas por meio do tipo de movimento, da morfologia do parasito e de seu conteúdo citoplasmático.

Essa técnica deve ser realizada todas as vezes que amostras pastosas ou diarreicas com muco e sangue cheguem ao laboratório, antes de decorridos 30 min da sua coleta. Havendo suspeita de amebíase, recomenda-se coletar as amostras no próprio laboratório.

Por meio deste método podem-se observar formas móveis de *E. histolytica* de cor pálida e transparente, característica para as quais se recomenda utilizar uma intensidade baixa de luz no microscópio. As formas móveis observadas emitem pseudópodes finos, longos e rápidos, partindo de vários pontos do corpo do parasito, observando-se, às vezes, a emissão de um único pseudópode anterior, deslizando sobre a superfície da lâmina. Não é comum observar as características nucleares dos trofozoítos em fezes recentemente emitidas, porém, na prática diária são observadas estruturas nucleares quase nítidas em fezes após 2 h de excretadas. A distinção entre o ectoplasma e o endoplasma é evidenciada principalmente se as amebas estiverem em constante atividade.

O ectoplasma é hialino e distinto, o endoplasma é granular e de fácil observação, e os vacúolos digestivos, que podem aparecer com hemácias fagocitadas ou conteúdos hemoglobínicos, são bem observados no endoplasma (Figura 21.1A). Já o núcleo normalmente não é observado nas preparações a fresco, e, nos parasitos em fase de degeneração, pode-se observá-lo como um anel de pequenos grânulos e de localização central ou excêntrica.

Alguns autores confirmam que parasitos que apresentam as características morfológicas citadas com hemácias nos seus

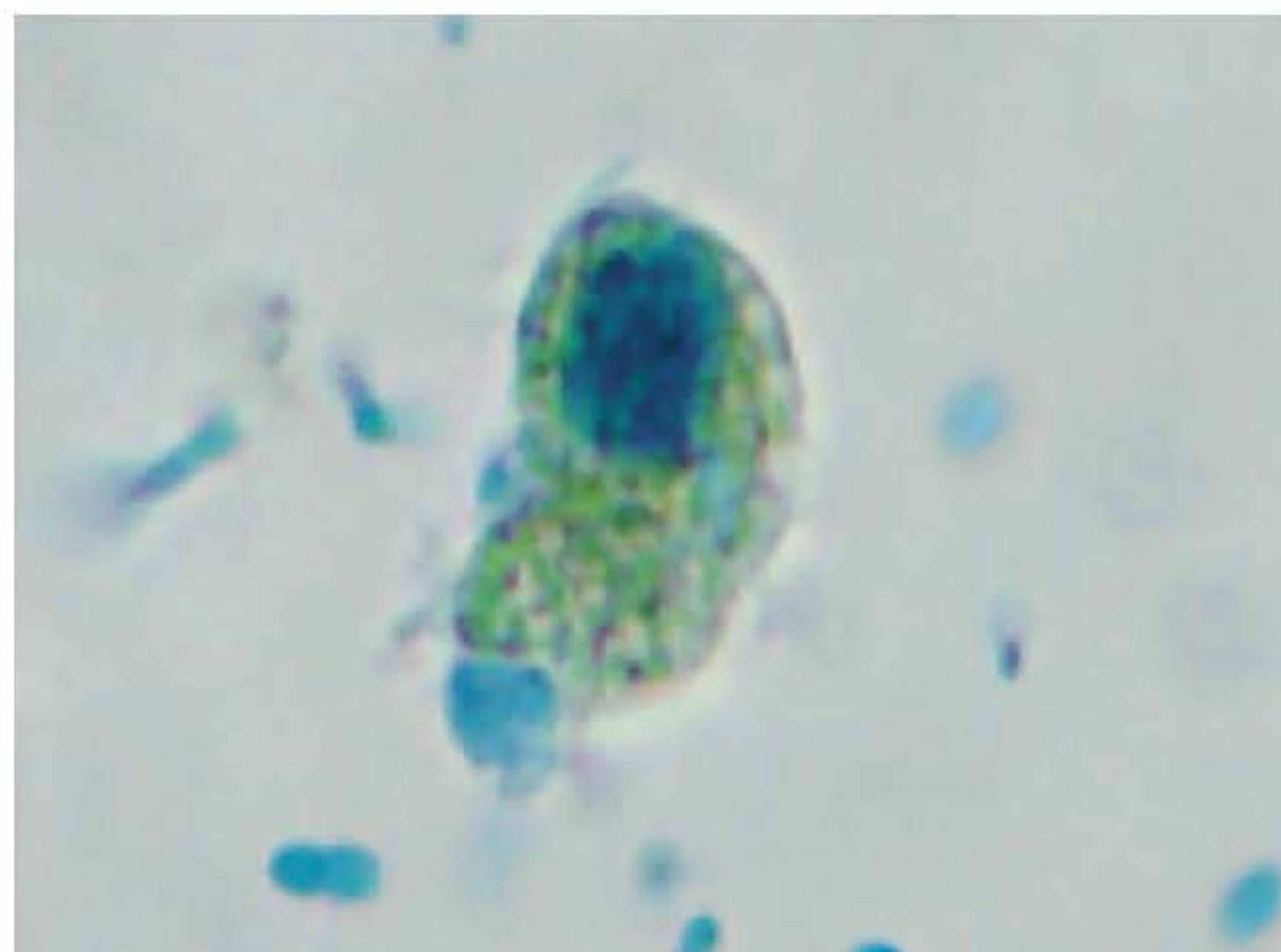


Figura 21.2 Macrófago corado pelo azul de metileno.

vacúolos digestivos são diagnosticados seguramente como *E. histolytica*. É importante ressaltar, contudo, que macrófagos podem ser confundidos com ameba, uma vez que apresentam movimentos ameboides e podem conter células sanguíneas no seu interior (Figura 21.2).

Note-se ainda que trofozoítos de *E. histolytica/dispar* (Figura 21.3A) devem ser diferenciados daqueles de *E. hartmanni* (Figura 21.3B), que são menores até 10 µ, mas com características morfológicas e movimentos progressivos semelhantes.

Também é importante diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, as quais apresentam tamanhos e características morfológicas semelhantes.

Assim, entendemos que a identificação de *E. histolytica* não deve ocorrer somente pelo método direto e pela coloração temporária, sendo importante o uso de coloração permanente das amostras (Figura 21.4), bem como de métodos imunoenzimáticos para a pesquisa do antígeno específico da *E. histolytica* em fezes não preservadas, que vêm sendo aperfeiçoados e são de fáceis execuções, além de ter boa sensibilidade. Isso é observado atualmente com o teste RIDASCREEN® Entamoeba, na prática diária.

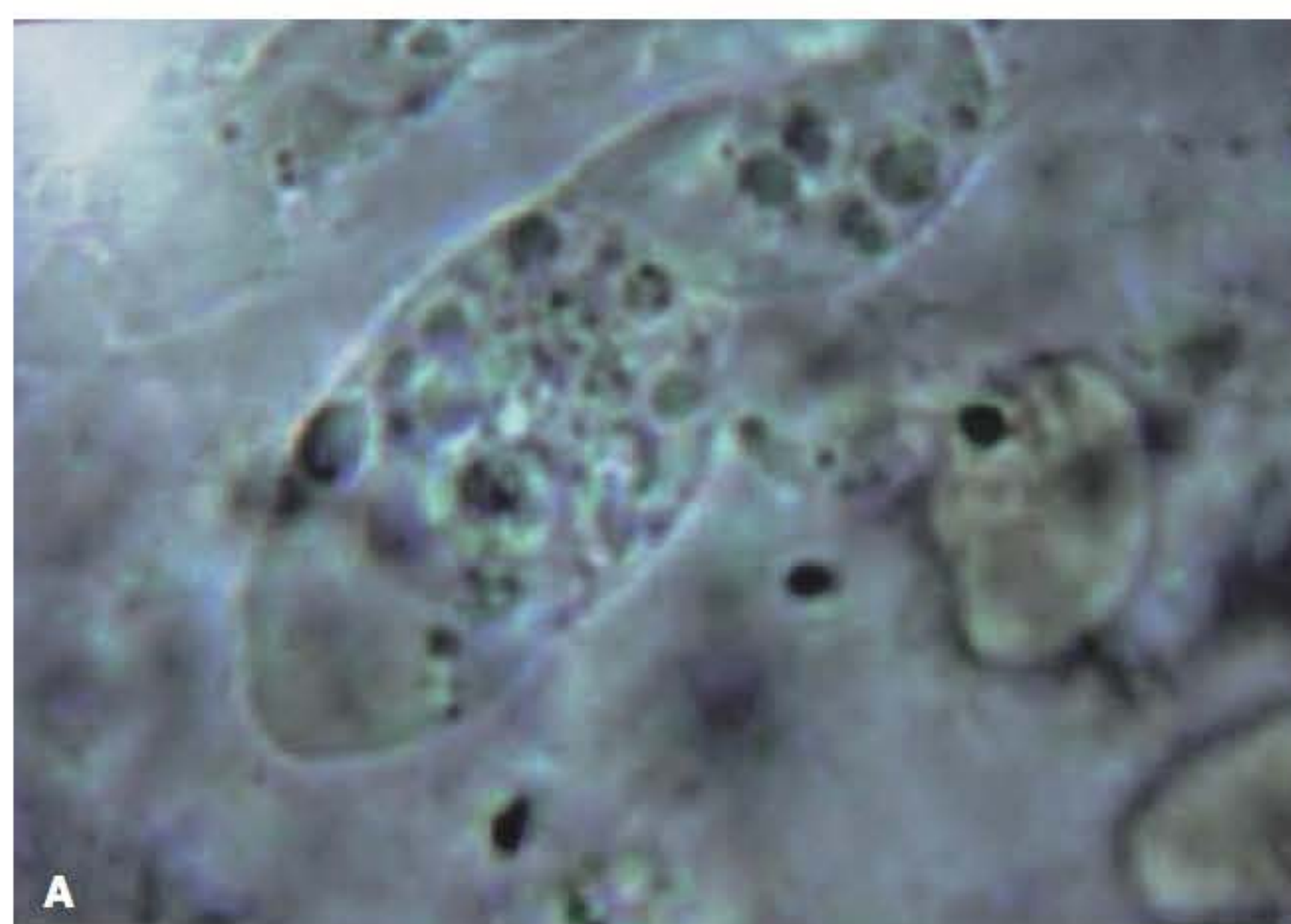
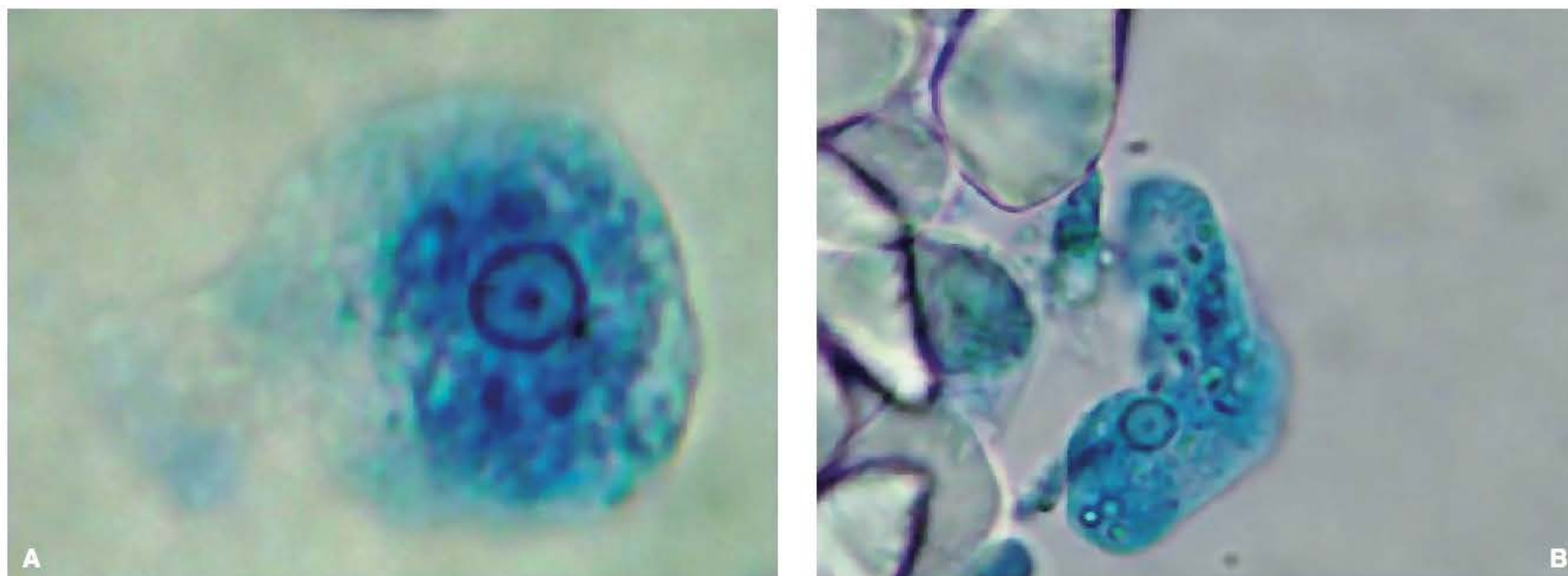


Figura 21.1 A. Trofozoíto de *E. histolytica* em preparação a fresco. Observe várias hemácias no citoplasma. B. Trofozoíto de *E. histolytica/dispar* preservada no APV antes da coloração permanente.





**Figura 21.3** *Entamoeba histolytica/dispar* (A) e *Entamoeba hartmanni* (B), ambas coradas pelo azul de metileno.



**Figura 21.4** Trofozoítos de *Entamoeba histolytica/dispar*, corados pela hematoxilina férrica.



**Figura 21.5** Trofozoíto de *Entamoeba histolytica/dispar*, corado pelo azul de metileno.

### Método direto a fresco corado pelo azul de metileno

O objetivo deste método é pesquisar formas vegetativas de ameba em fezes diarreicas, procurando evidenciar suas estruturas citoplasmáticas e nucleares. A técnica pelo azul de metileno tamponado contribui para identificação da *E. histolytica* e de outros tipos de ameba nas preparações recentes, uma vez que, em fezes antigas, as estruturas dos parasitos sofrem muitas modificações. Após 7 a 10 min da coloração, observa-se uma perfeita distinção entre o ectoplasma e o endoplasma. O primeiro corado em azul-claro e o segundo mais fortemente corado, observando-se vacúolos digestivos contendo uma ou várias hemácias coradas em azul-escuro. A membrana nuclear mostra-se uniformemente corada, não se observando nitidamente os grãos de cromatina. O cariossoma apresenta-se como um pequeno ponto central, ocasionalmente excêntrico, corado em azul-escuro. Entre a membrana nuclear e o cariossoma, observa-se um espaço nítido corado em azul-claro (Figura 21.5). Recomenda-se usar o azul de metileno, principalmente quando se suspeita de coexistência de infecção amebiana e bacilar em uma mesma amostra, uma vez que os leucócitos são bem corados e facilmente observados.

Ocasionalmente, observam-se parasitos que não coram, enquanto outros podem reter fortemente o corante no núcleo, dificultando a sua identificação.

### Método de coloração pelo tricrômio

Muitos parasitologistas recomendam a coloração pelo tricrômio, considerando-o o método ideal para o trabalho de rotina, uma vez que oferece resultados satisfatórios com fezes recentes e fixadas pelo APV, Schaudinn ou SAF. Trata-se de um método relativamente simples, que visa pesquisar e identificar cistos e trofozoítos de amebas. Os reagentes utilizados na coloração são colocados em cubas que são mantidas fechadas e identificadas. Com o auxílio de uma espátula ou de um palito, toma-se uma pequena porção das fezes já preservadas no APV por 60 min, colocando-a sobre papel-filtro por três minutos, que tem por objetivo retirar o excesso do fixador; em seguida, faz-se um esfregaço delgado, dando preferência ao local que contenha muco. Após, deve-se deixar secar a temperatura ambiente, para, em seguida, proceder a coloração.

Se as fezes estiverem consistentes, deverão ser misturadas com salina, a fim de que se possa obter um preparado satisfatório para proceder ao esfregaço. Durante todo o processo de coloração é importante que o esfregaço seja mantido úmido.



Toda vez que se transferir a lâmina de uma cuba para outra, deve-se fazê-lo com o auxílio de uma pinça de inox, drenando-se o excesso de corante sobre um papel absorvente e mantendo-se a lâmina inclinada. Também se recomenda passar rapidamente papel absorvente na parte da lâmina em que não haja esfregão. Quanto menos quantidade de corante passar de uma cuba para outra, melhor produto final de coloração será observado. Se a lâmina começar a secar, deve-se colocá-la de volta no xilol, drenar e fazer a montagem com verniz cristal autêntica, que tem a vantagem de secar mais rápido e clarear a preparação. Note-se que a fixação é uma etapa muito importante na coloração pelo tricrômio. Os cistos jovens ou imaturos fixam com maior facilidade que os cistos maduros. Já os cistos de *Entamoeba coli* requerem uma fixação mais prolongada que os de outras espécies, em razão, provavelmente, da espessura de sua parede. Quando forem detectados microrganismos com uma coloração avermelhada, esta poderá ser atribuída a uma fixação inadequada ou a uma amostra velha.

Quando a fixação do esfregão é adequada, observam-se com clareza as estruturas citoplasmáticas e nucleares dos protozoários. Nos trofozoítos observa-se o citoplasma corado em verde-azulado, podendo conter no seu interior hemácias ou conteúdos hemoglobínicos que tomam coloração púrpura. Já a cromatina nuclear dos trofozoítos e dos cistos, bem como os corpos cromatóides dos cistos, também coram em vermelho-púrpura (Figura 21.6A e B). Outros materiais existentes no esfregão como leveduras, células teciduais, *Blastocystis* etc. tomam a cor verde.

O método original do tricrômio requer aproximadamente 45 min para ser executado; em métodos mais recentes, no entanto, o tempo foi reduzido para 8 a 12 min.

Algumas das vantagens de se utilizar a coloração pelo tricrômio incluem:

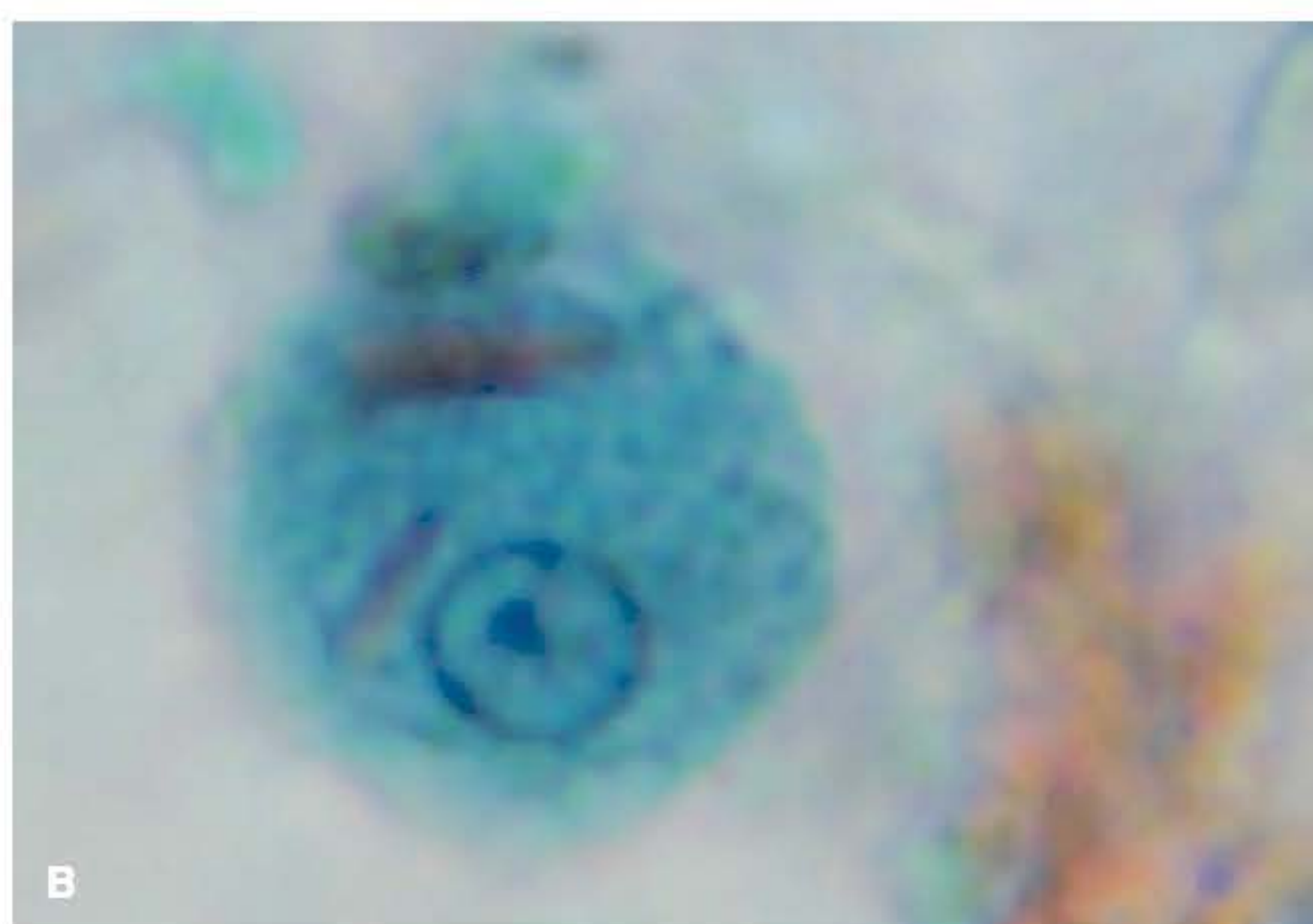
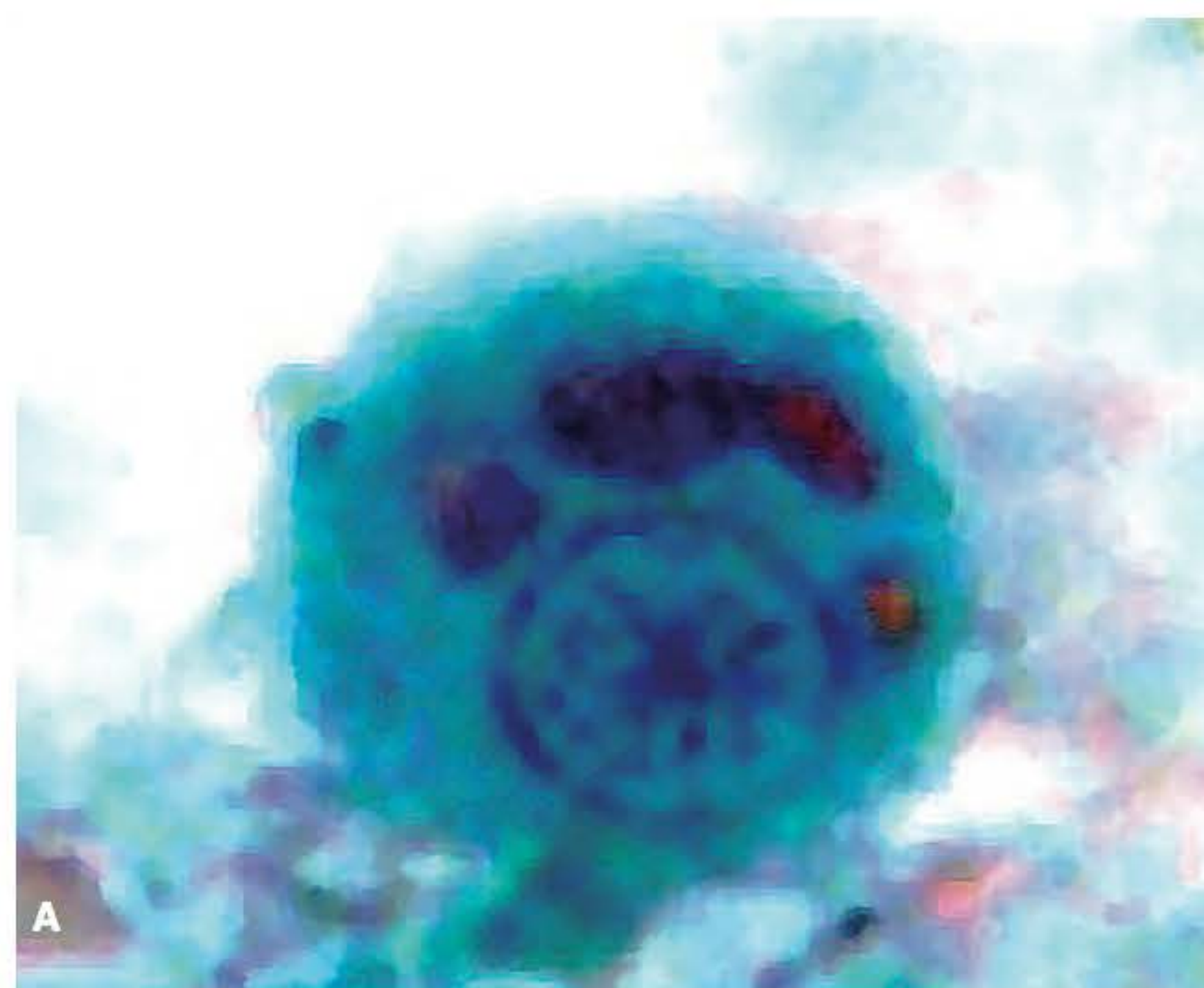
- O corante é estável e pode ser utilizado repetidamente
- Os métodos mais rápidos, que eliminam alguns passos da coloração, são adequados para pequenos laboratórios, em que poucas lâminas são coradas de cada vez
- O procedimento não requer o uso de mordente ou corante diferencial
- Dependendo da modificação empregada, o procedimento pode ser automatizado.

As desvantagens de se utilizar a coloração de tricrômio são:

- O contraste obtido entre os parasitos e detritos fecais não se compara àquele obtido utilizando-se a coloração de hematoxilina férrica, mostrando-se frequentemente insuficiente para possibilitar o exame dos parasitos sob objetivas de pequeno aumento
- Algumas técnicas, oriundas de modificações no método original, requerem tantas manipulações individuais que resultam inadequadas para uso em laboratório de grande porte.

### Técnica de coloração por hematoxilina férrica

A amostra será tratada por um fixador que irá manter as características morfológicas das amebas e, posteriormente, será corada pela solução de hematoxilina, em que será obtida a cor desejada por meio do uso de uma solução mordente que irá tirar o excesso do corante (coloração regressiva) ou progressivamente, sem passar pela solução diferenciadora. Esta coloração visa identificar as amebas mediante a coloração



**Figura 21.6 A.** Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* com hemácias em seu citoplasma. **B.** Cisto de *Entamoeba histolytica/dispar*, corado pelo tricrômio.

de suas estruturas nucleares que têm grande afinidade para os corantes básicos. Atualmente, existem vários processos de coloração pela hematoxilina férrica, desde o processo longo e clássico, de acordo com Heiderhain (1908), até outros processos modificados. O processo clássico, conforme Heiderhain, é um método que garante excelentes resultados quando todas as etapas do procedimento de coloração são observadas. Pode ser preparado com fezes frescas ou conservadas nos fixadores Schaudinn ou APV.

Alguns desses métodos modificados são complexos, consomem tempo e requerem pessoal experiente para assegurar que os resultados sejam confiáveis. Esses problemas têm sido solucionados, incluindo-se novas modificações, obtendo-se métodos mais curtos e menos complexos, muitos dos quais incorporam o mordente ao corante.

O procedimento para coloração pela hematoxilina férrica que utiliza fezes conservadas no fixador é o processo mais recomendado. O processo de coloração, de acordo com Cláudio Santos Ferreira, é um método mais rápido que os demais, uma vez que as passagens pelas placas de alcoóis e de creosoto são suprimidas. Utiliza fezes não preservadas e, como fixador, uma solução



de ácido pícrico saturado com adição de formol a 40% e ácido acético glacial (fixador de Bouin). Esse método apresenta resultados satisfatórios desde que o técnico esteja bem familiarizado com ele. Sua vantagem é o pouco tempo gasto na execução.

A hematoxilina férrica que utiliza fezes preservadas é, sem dúvida, o método que oferece maior segurança na identificação e no diagnóstico da *E. histolytica*.

Cabe salientar que a modificação que combina o corante com o mordente proporciona excelente reprodutibilidade nos resultados, além do método, apesar de demorado, poder ser facilmente automatizado.

Algumas desvantagens podem ser citadas no método de hematoxilina férrica. A qualidade do corante depende do número de amostras processadas diariamente, devendo-se repor o corante a intervalos regulares, o que aumenta o custo do procedimento. A camada de APV pode se dissolver na solução aquosa utilizada durante a coloração, fazendo com que o material fecal se solte da lâmina. Isso pode ser evitado adicionando-se gotas de albumina ao material, pois a substância age como um adesivo na preparação do esfregaço.

Os trofozoítos apresentam cor cinza-azulada, diferenciando-se de estruturas de tonalidades escuras. Seu tamanho varia entre 15 e 60  $\mu$ . Amebas encontradas em pacientes assintomáticos apresentam tamanho médio de 15  $\mu$ . Por sua vez, entre os pacientes sintomáticos, isto é, os de colite não disenterica, a média dos diâmetros dos trofozoítos é de 20  $\mu$ . Amebas maiores são observadas em pacientes com manifestações clínicas de disenteria amebiana. O citoplasma é distinto e observa-se uma nítida diferenciação entre o ectoplasma e o endoplasma, principalmente se a forma observada estava emitindo pseudópodes quando da sua fixação. O ectoplasma apresenta-se hialino com uma coloração cinza-clara, diferenciando-se do endoplasma, que se apresenta granular e mais intensamente corado. No seu interior pode-se observar uma ou várias hemácias coradas em preto, evidenciadas nitidamente por um halo claro em toda sua parte externa. O núcleo geralmente não é central, permanecendo em local afastado da emissão dos pseudópodes, corando suas estruturas em preto (Figura 21.7).

O cariossoma geralmente é central, absorvendo mais intensamente o corante; os grânulos de cromatina são escuros e distribuídos uniformemente no interior da membrana nuclear, muitas vezes deixando espaços nitidamente claros entre os grânulos. Quando as preparações são bem coradas,

podem-se observar fibrilas fracamente coradas entre o cariossoma e a membrana nuclear.

A forma pré-cística é geralmente esférica, podendo apresentar-se oval, corando em azul-acinzentado e não apresentando diferenciação entre o ectoplasma e o endoplasma. Observa-se um espaço claro que ocupa 2/3 do parasito, o vacúolo de glicogênio, que não cora pela hematoxilina férrica. Pode-se observar-se um ou mais bastonetes de tamanhos diferentes corados em preto: são os corpos cromatoides.

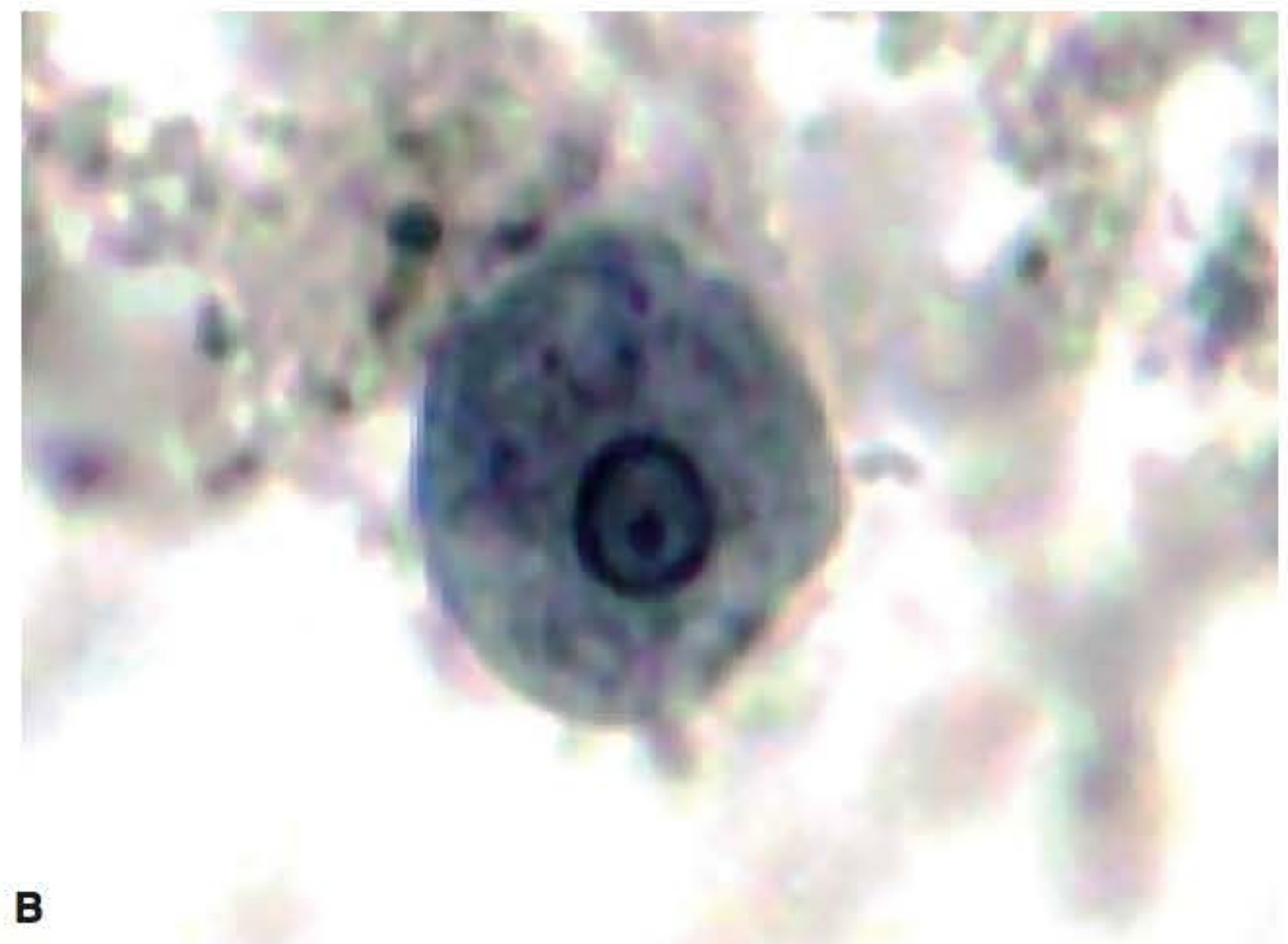
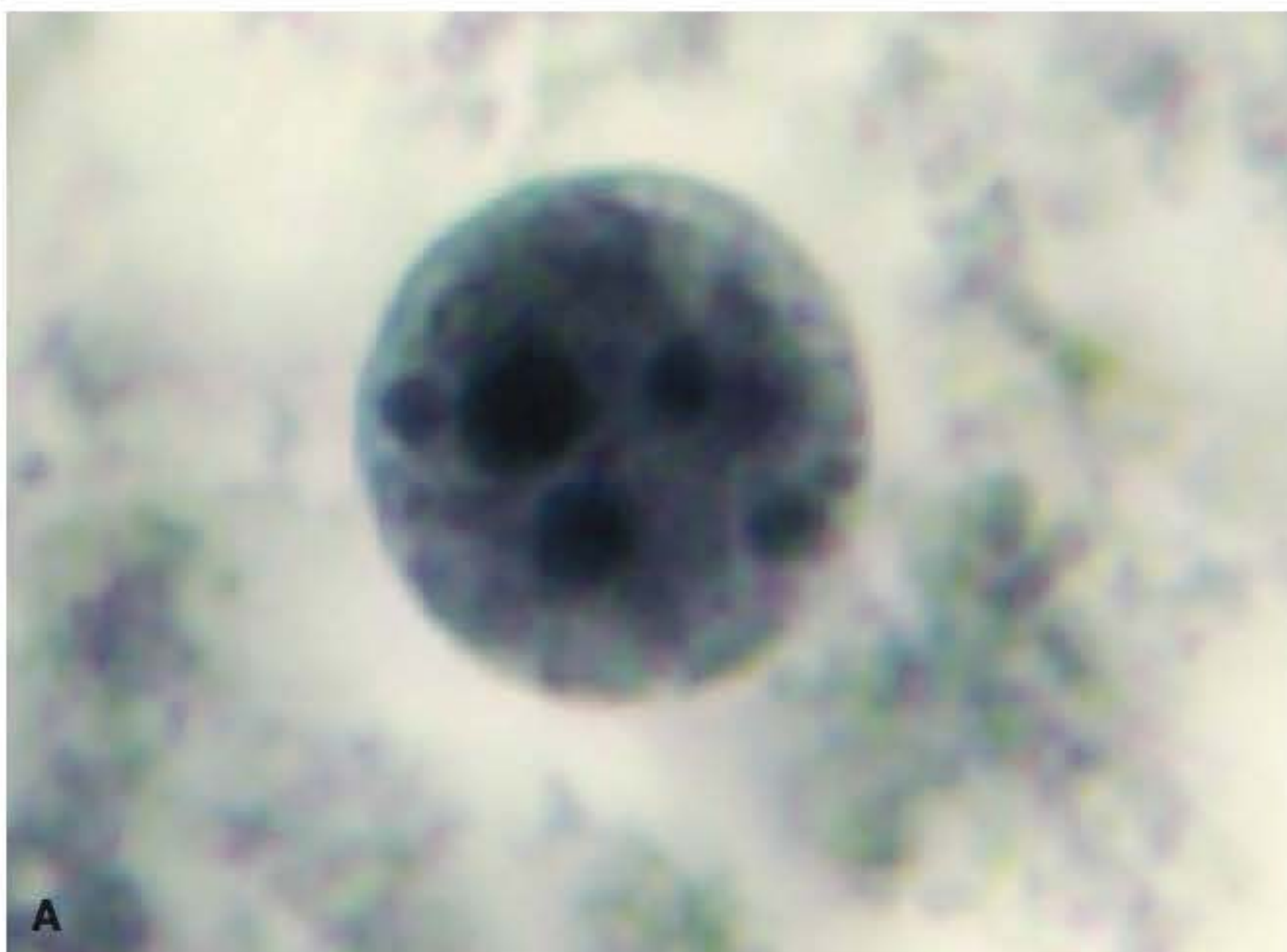
O núcleo apresenta as mesmas características observadas na forma vegetativa, diferenciando-se apenas no tamanho, sendo maior na forma pré-cística. Já o cariossoma é grande, de aspecto geralmente uniforme, podendo ocasionalmente apresentar-se irregular e corado intensamente em preto.

Nos cistos, pode-se observar uma nítida membrana cística corada em preto e o citoplasma tomando uma cor cinza-azulada, contendo um vacúolo de glicogênio grande e não corado. Os corpos cromatoides, mais frequentes nos cistos imaturos, coram em preto e apresentam-se em quantidades variáveis; porém, dificilmente são observados nos cistos tetranucleados.

### Pesquisa de cistos nas fezes pelo método de Faust

Este método fundamenta-se em uma diferença de densidade, na qual os cistos flutuam quando tratados por uma solução de sulfato de zinco a 33% com densidade 1,180. Por meio do método de Faust corado pelo lugol, as chances de se fazer um diagnóstico de *E. histolytica/dispar* são grandes. Nos cistos, a tonalidade da coloração do citoplasma é amarelada e o vacúolo de glicogênio retém o lugol que pode ser observado como massa mais corada em amarelo-escuro. Os corpos cromatoides apresentam-se refringentes e em forma de bastão. Essas estruturas são mais observadas nos cistos imaturos. Os núcleos são bem distintos, e pode-se observar um cariossoma central e a cromatina finamente distribuída na membrana nuclear, sendo menores nos cistos tetranucleados.

Quando é utilizado o método de Faust para a pesquisa de cistos nas fezes coradas pelo lugol, podem-se observar nitidamente as estruturas morfológicas dos cistos; porém, esse método não possibilita o diagnóstico definitivo de *E. histolytica* apenas pelo encontro de cistos contendo de 1 a 4 núcleos, mesmo observando corpos cromatoides em forma de bastão, uma vez que a *Entamoeba dispar* é morfológicamente idêntica a *E. histolytica*. Recomenda-se, nesse caso, aplicar o resultado como encontro de cistos de *E. histolytica/dispar* (Figura 21.8).



**Figura 21.7 A.** Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* em que se observam hemácias em seu citoplasma. **B.** Trofozoíto de *Entamoeba histolytica/dispar* corado pela hematoxilina férrica.





**Figura 21.8** Cistos de *Entamoeba histolytica* (A)/*dispar* (B) corados pelo lugol.

### Pesquisas de amebas nos tecidos

A pesquisa de *E. histolytica* nos tecidos é realizada por meio da coleta do material por biópsia, durante a retossigmoidoscopia, examinado imediatamente a fresco e após coloração especial.

### Pesquisas de amebas nos exsudatos

As formas vegetativas de *E. histolytica* podem ser encontradas nos exsudatos (escarro, vômitos e, principalmente, em material coletado por punção de abscesso hepático). A amostra deve ser examinada a fresco e corada pela hematoxilina férrica ou tricrômio.

### ■ Cultura de *Entamoeba histolytica*

Pode ser cultivada a partir da sementeira direta do sedimento das amostras contendo cistos de *E. histolytica*, em meio de Pavlova modificado com adição de 1.000 unidades de peni-

cilina G potássica por ml de meio de cultura, e incubada a 36°C por 48 a 96 h, ou pode-se tratar o sedimento com HCl 0,5N por até 15 min e, após centrifugação, proceder à sementeira.

A *E. histolytica* pode ser cultivada em conjunto com bactérias encontradas nas fezes dos pacientes infectados (método polixênico simples de Pavlova).

Trabalhos publicados confirmam nossa observação de que as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp. favorecem o crescimento da *E. histolytica*, um número significativo de cistos deve ser utilizado e o sedimento deve ser semeado até 18 h após a emissão das fezes. Na prática diária, contudo, não se usa cultivar a *E. histolytica* em razão de sua dificuldade técnica, de seus custos e dos poucos significados em relação ao exame de fezes. No entanto, quando se deseja realizar estudos de inestimável valor no reconhecimento e na identificação da *E. histolytica*, de acordo com Carli (2007), deve-se cultivar as amebas em meio axênico, tendo como preferência o meio de Diamond, Harlow e Cunnick (Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum-TYI-S-33). Este tipo de cultivo irá possibilitar:

- Estudos de bioquímica, fisiologia e metabolismo dos organismos com o objetivo de estabelecer as exigências nutricionais dos parasitos
- Produção de antígenos e anticorpos monoclonais e policlonais contra a *E. histolytica* para o diagnóstico sorológico e outros estudos imunológicos
- Estudos diferenciais entre cepas patogênicas e não patogênicas por meio da eletroforese de isoenzimas em camada fina de gel de amido, que possibilitam distinguir os seguintes grupos, no gênero *Entamoeba*: *E. histolytica* – 9 zimodemos; *E. dispar* – 12 zimodemos; *E. hartmanni* – 3 zimodemos.

A análise de zimodemos é importante na diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar*, em razão das diferenças genéticas existentes na enzima hexoquinase dessas duas espécies (Rey, 2008).

### ■ Testes imunológicos

Os testes imunológicos para pesquisa de anticorpos são úteis no auxílio ao diagnóstico da amebíase. São positivos em 95% dos pacientes com abscesso hepático amebiano, em 70% dos pacientes com amebíase intestinal invasiva e em 5% daqueles que portam o parasito, mas não têm a doença clínica.

As técnicas imunológicas mais utilizadas atualmente são: hemaglutinação indireta (HAI), reação de fixação do complemento, aglutinação do látex, imunofluorescência indireta (IFI), eletroforese de isoenzimas, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ELISA.

A reação de fixação do complemento e a hemaglutinação são muito sensíveis; porém, apresentam o inconveniente de deixar dúvidas se a infecção é recente ou antiga, uma vez que, por meio dessas técnicas, não se pode avaliar se os anticorpos pesquisados são decorrentes da infecção aguda ou crônica.

O teste de aglutinação do látex é um teste muito simples, porém, apresenta o inconveniente de ser caro e ter sensibilidade inferior à da hemaglutinação.



A imunofluorescência indireta é um método muito bom, com boa sensibilidade e especificidade, porém os títulos são baixos em todas as fases da amebíase ulcerada.

Atualmente, a técnica de eletroforese de isoenzimas torna possível dizer que todas as amebas do intestino humano podem ser diferenciadas por meio de padrões isoenzimáticos. As amebas cultivadas de amostras obtidas em casos bem definidos de amebíase invasora (disenteria amebiana ou abscesso hepático) se agrupam em diferentes sistemas de padrões de isoenzimas, que são caracterizados pela presença de bandas específicas da enzima fosfoglucomutase e por bandas rápidas da enzima hexoquinase.

### ▪ Diagnóstico molecular

A PCR possibilita a amplificação de regiões específicas do DNA da *E. histolytica* e da *E. dispar*. Entre diversos métodos moleculares de diagnóstico, a PCR é tida como uma técnica altamente sensível e específica, bem como representa uma importante perspectiva diagnóstica para o controle da parasitose, de acordo com Carli (2007).

## ► Diferenciação das amebas parasitos do trato intestinal

A Figura 21.9 mostra os aspectos morfológicos que permitem caracterizar as diferentes amebas parasitos do trato intestinal.

### ▪ *Entamoeba dispar*

Durante muitos anos, *E. histolytica* e *E. dispar* foram consideradas como uma única espécie. No entanto, um recente e importante descobrimento biológico comprovou a existência de duas espécies distintas de *Entamoeba* que são morfologicamente idênticas por microscopia óptica.

A *E. dispar*, a espécie mais prevalente, é morfologicamente muito semelhante à *E. histolytica*. O diâmetro médio de um trofozoíto é de 25  $\mu$  (variando de 19 a 60  $\mu$ ), e os trofozoítos têm um núcleo simples de 3 a 5  $\mu$  em diâmetro que contém uma fina cromatina periférica e um nucléolo central. A presença de hemácias ingeridas se correlaciona positivamente com a presença de *E. histolytica*, e não com *E. dispar*. A média de diâmetro dos cistos é de 12  $\mu$  (variando de 5 a 20  $\mu$ ), e os cistos têm de um a quatro núcleos, dependendo de sua maturidade. Cistos jovens podem conter vacúolos

de glicogênio que coram com iodo e podem também conter densa aparência de corpos cromatóides que consistem em ribossomos.

Estudos têm demonstrado que *E. dispar*, em presença de bactérias intestinais, em portadores subnutridos e com baixa imunidade, pode apresentar potencial patogênico considerável na mucosa intestinal.

É importante enfatizar que *E. dispar* é responsável por mais de 90% das infecções causadas por amebas com características morfológicas semelhantes às de *E. histolytica*. Pessoas com infecção por *E. dispar* não apresentam evidência de invasividade, sangue oculto nas fezes e inflamação do cólon nem produzem anticorpos séricos para ameba. No homem, *E. dispar* vive como um comensal estável e avirulento, produzindo um estado de portador assintomático e sendo aproximadamente 10 vezes mais prevalente do que *E. histolytica*.

Numerosas diferenças antigênicas entre estas duas amebas têm sido demonstradas. Distintos epitopos da subunidade pesada com 170 kDa, uma importante adesina de superfície e um antígeno altamente conservado são encontrados em *E. histolytica*, mas não em *E. dispar*. Outros antígenos dos parasitos demonstraram espécie-especificidade similar. As diferenças bioquímicas, antigênicas e genéticas possibilitam diferenciá-las por meio de análise isoenzimática, anticorpos monoclonais e técnicas de biologia molecular, capazes de determinar sequências específicas de nucleotídeos como PCR.

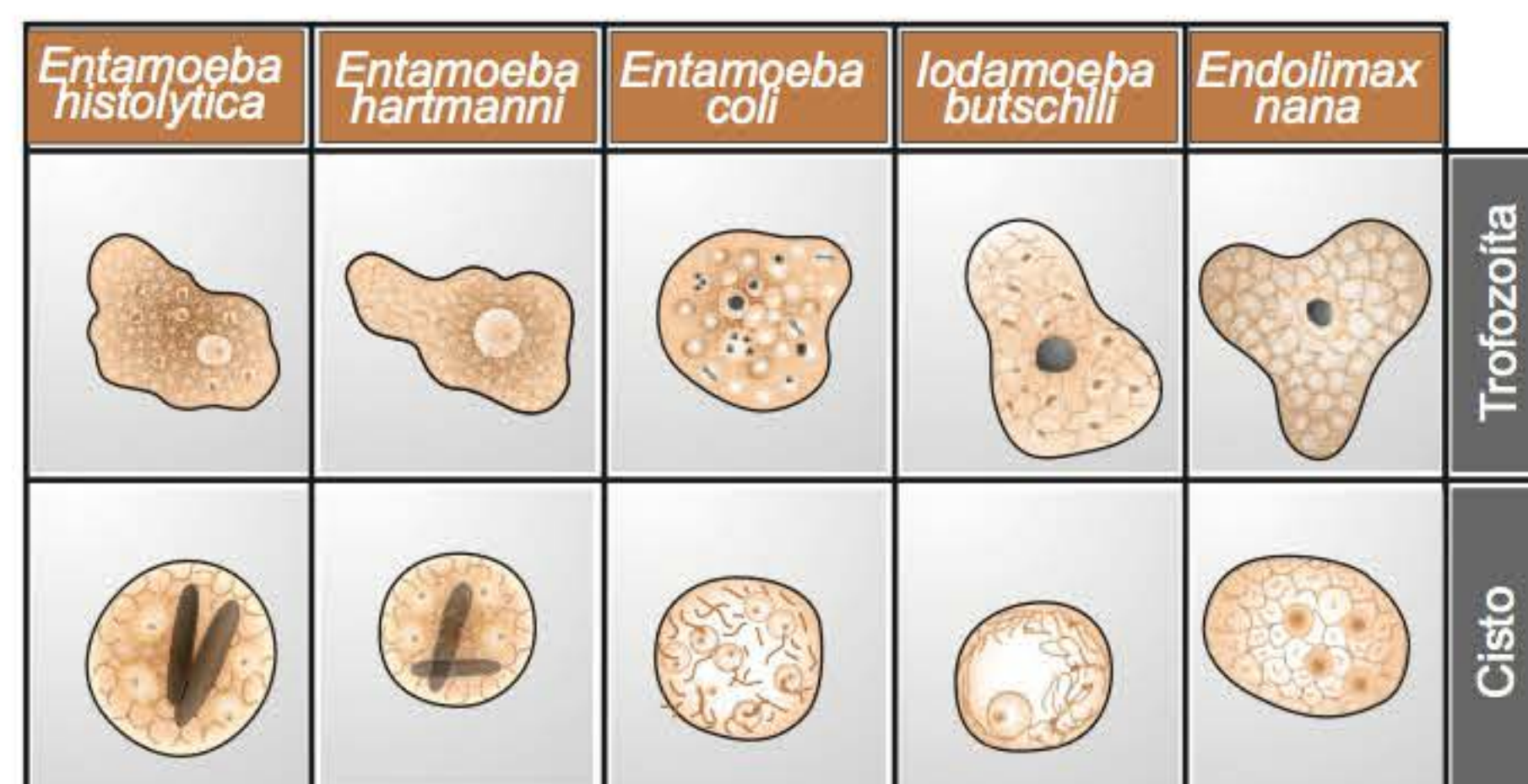
Na prática diária, o diagnóstico das amebas permanece dependente da identificação morfológica dos trofozoítos e cistos nas fezes, entretanto, testes imunológicos podem ser um instrumento útil no auxílio do diagnóstico de *E. histolytica*.

A diferenciação entre essas duas espécies é de suma importância, sendo essencial para a prevenção da doença invasiva, conduta terapêutica e para saúde pública.

### ▪ *Entamoeba hartmanni* (comensal)

As formas vegetativas de *E. hartmanni* são morfologicamente semelhantes às de *E. histolytica*, normalmente pequenas, com tamanhos que variam entre 4 e 10  $\mu$ , e apresentam movimentação ativa, com pouca diferenciação entre o ectoplasma e o endoplasma. Nas preparações coradas pela hematoxilina férrica, observam-se no citoplasma vacúolos e detritos, mas nunca hemácias. O núcleo é pequeno, em torno de 2  $\mu$ , os grãos de cromatina são uniformes, podendo apresentar disposição irregular, e o cariossoma é central ou ligeiramente excêntrico.

Os cistos de *E. hartmanni* são semelhantes aos de *E. histolytica*, porém menores, em torno de 6  $\mu$ , contendo de 1 a



**Figura 21.9** Aspectos morfológicos de amebas parasitos do trato intestinal.



4 núcleos. Nos cistos imaturos observam-se corpos cromatóides que variam de 3 a 6, um pouco diferentes dos observados em *E. histolytica* em razão de sua irregularidade. Os núcleos são bem observados quando corados pela hematoxilina férrica ou pelo lugol, apresentando as mesmas características descritas para as formas vegetativas. Já o citoplasma apresenta vários espaços pequenos e claros resultantes do vacúolo de glicogênio.

Esta ameba não engloba hemácias, e os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos específicos são negativos.

### ▪ *Entamoeba coli*

As formas vegetativas de *E. coli* (Figura 21.10A e B) vivem como comensais no lúmen do intestino grosso. É importante conhecer suas características morfológicas para diferenciá-las de *E. histolytica*.

Nas preparações a fresco em fezes recentemente emitidas, apresenta-se geralmente com emissão de pseudópodes lentos e não direcionais, menores e mais largos que os de *E. histolytica*. O citoplasma com granulações grosseiras, sem distinção entre o ectoplasma e o endoplasma, contém no seu interior bactérias e outros detritos intestinais, não fagocita hemácias e o núcleo é visível.

Corada pela hematoxilina férrica, toma uma cor cinza-azulada. A membrana nuclear grosseira e os grãos de cromatina se distribuem um pouco irregularmente, o cariossoma é excêntrico e maior do que o de *E. histolytica*. A forma pré-cística apresenta características muito semelhantes às de *E. histolytica*. Os cistos de *E. coli* são maiores, medindo de 10 a 30  $\mu$  de diâmetro, e contêm de 1 a 8 núcleos. Quando corada pela hematoxilina férrica, a membrana nuclear se apresenta grosseira, com grânulos irregulares dispostos sobre ela, os corpos cromatóides, que, quando presentes, apresentam-se em forma de pincel e desaparecem dos cistos rapidamente. Já na coloração pelo lugol, os cistos são bem evidenciados, apresentam forma esférica, algumas vezes oval ou irregular, com cariossoma excêntrico.

### ▪ *Iodamoeba butschlii*

É uma pequena ameba, comumente encontrada no porco, com incidência em torno de 14% no homem. Seu tamanho varia de 12 a 15  $\mu$ , em média 13  $\mu$ .

Nas preparações a fresco, pode-se observar a formação de pseudópodes largos e lentos, com pouca diferenciação entre o ectoplasma e o endoplasma. Corada pela hematoxilina férrica, observa-se o núcleo com uma membrana espessa e sem cromatina periférica, com cariossoma grande e central, algumas vezes excêntricos. Os cistos não apresentam corpos cromatóides, contêm um núcleo e um grupamento iodófilo que retém fortemente o lugol, tomando a cor castanho-escuro, facilmente observado, ocupando 1/3 da célula. Nas preparações pela hematoxilina férrica o grupamento iodófilo se dissolve pela ação dos reativos, formando um espaço claro no citoplasma.

### ▪ *Endolimax nana*

É uma das menores amebas que parasitam o homem, e seu tamanho varia de 6 a 12  $\mu$ . Nas preparações a fresco, observa-se essa pequenina ameba emitindo pseudópodes largos e rombos de forma lenta, contendo bactérias e detritos nos seus vacúolos; o núcleo geralmente é visível, porém, em algumas ocasiões, não é observado.

Corada pela hematoxilina férrica, pode-se observar a membrana nuclear fina, sem grão de cromatina; o cariossoma é grande, podendo apresentar forma variada, central ou excêntrica.

## ► Conclusão

Entende-se que o diagnóstico de *E. histolytica* nem sempre é fácil e que as falhas podem resultar em técnicas imperfeitas, pesquisas inadequadas ou interpretação confusa de *E. histolytica* com outros protozoários ou células sanguíneas. Assim, somos levados a concluir que:

- A associação de vários métodos no diagnóstico de *E. histolytica* é muito importante, uma vez que nenhum deles é absoluto
- É importante contar com técnicos bem treinados para a interpretação de exames parasitológicos
- O número de amostras satisfatórias para um diagnóstico seguro por métodos tradicionais deve ser de três, e elas devem ser analisadas em períodos de 8 dias
- As amostras suspeitas devem ser levadas ao laboratório até 30 min após a sua coleta, ou serem coletadas em frascos contendo preservantes



**Figura 21.10** A. Forma vegetativa da *Entamoeba coli* a fresco. B. Cisto corado pelo lugol.



- A pesquisa de antígenos específicos de *E. histolytica* em extrato aquoso de fezes não preservadas deve fazer parte da rotina laboratorial para confirmar os achados parasitológicos e evitar o diagnóstico errôneo de *E. histolytica* com leucócitos e outros tipos de amebas.

## ► Bibliografia

- Alexon. Advancing the Diagnostics of Intestinal Infections, 1993.
- Amato Neto V, Baldy JLS. Doenças Transmissíveis. São Paulo: Sarvier, 1989.
- Amato Neto V, Correa de Lacerda L. Exames Parasitológicos das fezes. São Paulo: Sarvier, 1980.
- Brown WH. Parasitologia Clínica. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977.
- Bruckner DA. Amebiasis. Clin Micro Rev 1992; 5: 356-369.
- Carli GA. Parasitologia Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.
- Carli GA. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1994.
- Cunha AS. Patogenia da Amebíase. Belo Horizonte: Minas Gerais Gráfica, 1975.
- Garcia SL, Ash RL. Diagnóstico Parasitológico. São Paulo: Panamericana, 1983.
- Graig CF. The Etiology, Diagnosis and Treatment of Amebiasis. Baltimore: The Williams Wilkins Company, 1994; 332 pp.
- Henry JB. Diagnóstico Clínico e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais. São Paulo: Manole, 1983.
- Krogstad DI, Spencer HC Jr, Healy GR *et al.* Amebiasis: Epidemiologic Studies in the United States, 1971-1974. Ann Intern Med 1978; 88(1): 89-97.
- Lima AO, Soares JB, Greco JB *et al.* Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- Miller, O. Laboratório para o Clínico. São Paulo: Atheneu, 1985.
- Minami PS, Miche MP, Yamamoto YI. Métodos Laboratoriais Aplicados ao Diagnóstico das Parasitoses. São Paulo: Mc Will, 1985.
- Neves DP. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 1986.
- Neves DP. Parasitologia Dinâmica. São Paulo: Atheneu, 2003.
- Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- Petithory JC, Brumpt LC, Poujad F. *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 19030 et *Entamoeba dispar* E. Brumpt 1925 sont deux espèces différentes. Bull Soc Path Ex 1994; 87: 231-237.
- Proctor EM. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Labor Med 1991; 11(4): 829-859.
- Ravdin JI. Amebiasis. Clin Infec Dis 1995; 20: 1453-1466.
- Rey L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- Rey L. Parasitologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RIDASCREEN – Entamoeba 2004. Articles.
- Sloan LM, Roseblatt J. Evaluation of an imunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in stool specimens. Am J Trop Med Hyg 1994; 51(3): 180.
- Sommers YP. Bases Biológicas e Clínicas das Doenças Infecciosas. São Paulo: Artes Médicas, 1983.
- Vallada EP. Manual de Exames de Fezes. São Paulo: Atheneu, 1988.
- Veronesi R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972.
- WHO – World Health Organization (Tradução: Levanon Y). Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica. São Paulo: Santos, 1994.
- Zaman V. Atlas Colorido de Parasitologia Clínica. São Paulo: Médica Panamericana, 1993.



## Capítulo 22

---

# Doença de Chagas

*Antonio Walter Ferreira*

- Introdução, 269
- Aspectos clínicos e epidemiológicos, 270
- Diagnóstico de laboratório, 271
- Padronização do diagnóstico de laboratório da doença de Chagas, 275
- Bibliografia, 276



## ► Introdução

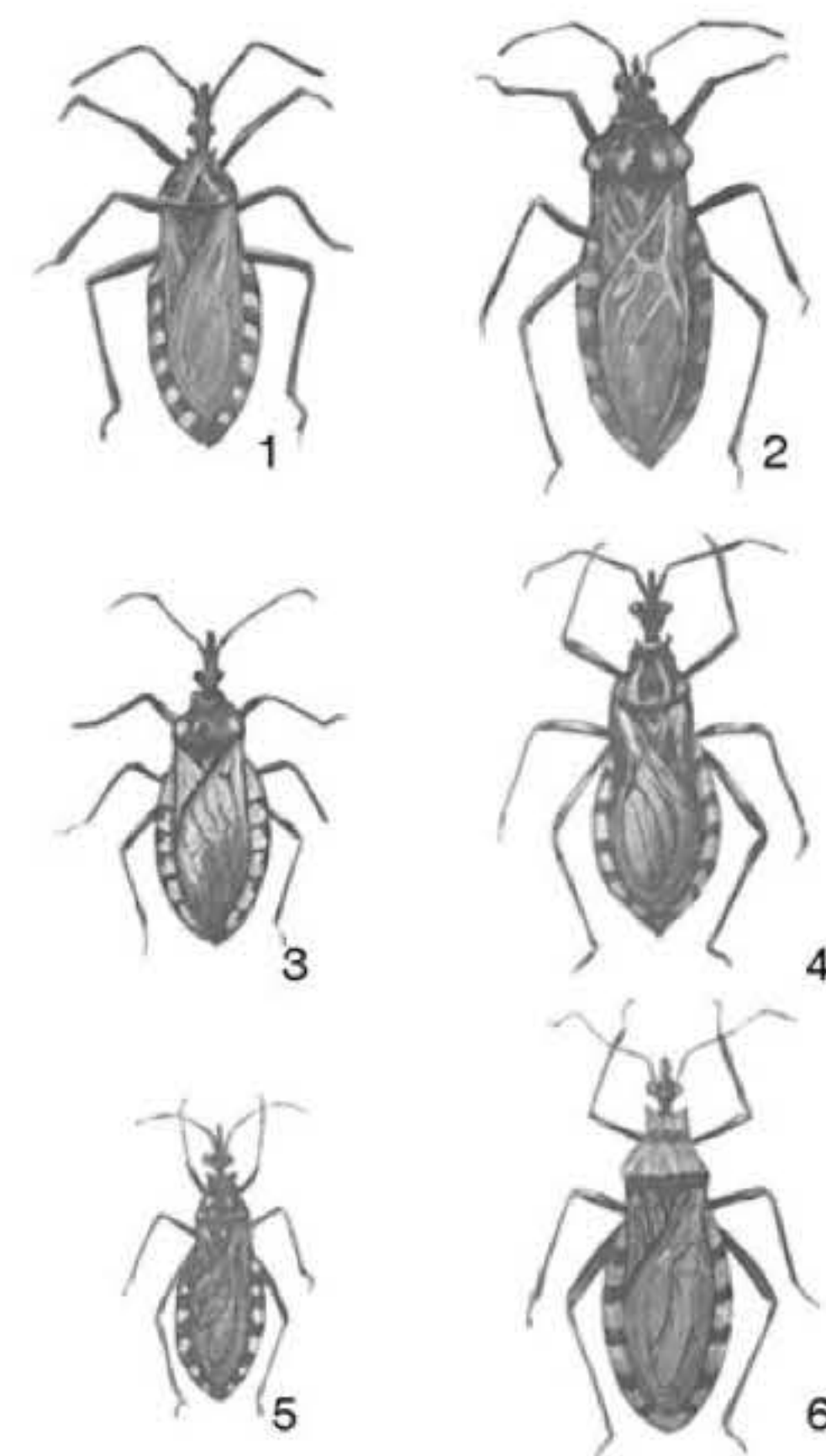
O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário caracterizado por flagelo e mitocôndria, na qual está situado o cinetoplasto. Está classificado na seção Stercoraria da família Trypanosomatidae, que inclui tripanossomos que se desenvolvem no tubo digestivo de vetores e são transmitidos na forma de tripomastigotas metacíclicos pelo contato direto com as fezes do vetor. Apresenta alto grau de heterogeneidade, o que dificulta os estudos epidemiológicos, clínicos, patológicos, terapêuticos e laboratoriais.

Originalmente encontrado em muitas espécies animais, chegou à espécie humana por meio de insetos vetores pertencentes à subfamília Triatomina, família Reduviidae, ordem Hemiptera. Na América Latina, os vetores mais importantes, relacionados com a transmissão do parasito, são *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Triatoma brasiliensis* (Figura 22.1).

O ciclo de vida do parasito é estudado no vetor e no hospedeiro vertebrado. No vetor, inicialmente, formas tripomastigotas ingeridas com o sangue do hospedeiro diferenciam-se no intestino em epimastigotas e um pequeno número de formas arredondadas, amastigotas que rapidamente multiplicam-se no intestino do vetor, podendo permanecer latentes por um longo período de tempo. Essas formas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas no reto e são eliminadas com as fezes durante ou depois do repasto do inseto. Existem mais de 100 espécies de mamíferos que são suscetíveis à infecção por *T. cruzi*. Os hospedeiros vertebrados podem ser domésticos ou selvagens. No hospedeiro, formas tripomastigotas intracelulares se transformam em amastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária. O número de parasitos que infectam as células varia de 50 a 500 parasitos por célula. As formas amastigotas se transformam em tripomastigotas que, na circulação, promovem a disseminação da doença e a oportunidade para a continuidade do ciclo quando os vetores ingerem o sangue dos hospedeiros. A Figura 22.2 mostra as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*.

Nas áreas urbanas, a transmissão por transfusão de sangue e derivados apresenta grande importância como consequência da migração de populações de áreas endêmicas para centros industrializados em busca de trabalho. É considerada a segunda via mais importante de transmissão da doença.

A análise de inquéritos sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* em doadores de sangue feita em 1993 em dez países mostrou que a probabilidade de um receptor receber uma bolsa com sangue contaminado por *T. cruzi* variou de 10% na Bolívia para 0,13% ou 0,138% em Honduras e Venezuela, onde a cobertura sorológica na triagem dos doadores era de 100%. Por outro lado, a probabilidade de transmissão de uma



**Figura 22.1** Espécies de vetores transmissores da doença de Chagas. 1. *Triatoma infestans*; 2. *Panstrongylus megistus*; 3. *Triatoma sordida*; 4. *Triatoma brasiliensis*; 5. *Triatoma maculata*; 6. *Panstrongylus geniculatus*.

bolsa contaminada por *T. cruzi* variava de 2,19% na Bolívia para 0,24% na Colômbia, 0,17% em El Salvador e menos de 0,15% nos demais países. O risco de infectividade, definido como a probabilidade de o indivíduo ser infectado por sangue contaminado, foi estimado em 20% para a América Latina. Nessa base foi possível estabelecer um número absoluto que variava de acordo com a cobertura sorológica na triagem dos doadores. De 1993 a 1996, Honduras, Venezuela, Argentina, El Salvador, Paraguai, Uruguai e Colômbia instituíram a obrigatoriedade da cobertura sorológica total na triagem dos doadores de sangue. Em 1996, a triagem preveniu a transfusão de 36.017 bolsas positivas e 7.201 casos de infecção transfusional.

Outros meios de transmissão são citados na literatura, como a congênita, por transmissão vertical, a acidental, normalmente em laboratórios de pesquisa ou rotina, e a oral, por ingestão de alimentos contaminados com vetores ou excretas de vetores parasitados. Esse meio de transmissão tem assumido grande importância na Região Norte do Brasil. No Pará, o consumo crescente de açaí tem provocado inúmeros casos de doença de Chagas aguda tanto em crianças como em adultos. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Estado, em conjunto com o Ministério da Saúde, tem somado esforços na tentativa



**Figura 22.2** Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Epimastigotas (e) e tripomastigotas metacíclicos (t) em um esfregaço de material de cultura. **B.** Tripomastigotas em esfregaço de sangue. **C.** Amastigotas em cultura de fibroblastos.



de diminuir o número de casos. Porém, trata-se de um problema que envolve aspectos sociais e culturais, pelo número de pessoas que vivem do comércio do suco de açaí e que não têm conhecimento de normas de higiene para manipular o produto. Uma das maneiras de impedir a transmissão oral por açaí é por meio da pasteurização, que não é feita normalmente. Esse é um problema que tende a se agravar nos próximos anos.

## ► Aspectos clínicos e epidemiológicos

A doença de Chagas tem duas apresentações clínicas: a adquirida e a congênita. A congênita, associada ao nascimento prematuro, ao aborto e à placentite é rara, ocorrendo em menos de 1% dos casos diagnosticados. Tem sido relatada em muitas áreas da América do Sul (p. ex., Bolívia), o que resulta em cerca de 8.000 novos casos por ano. A transmissão congênita dificilmente pode ser evitada durante a gravidez porque os fármacos utilizados no tratamento da doença são tóxicos e teratogênicos e o aborto preventivo, inaceitável. Em países como o Brasil, onde os casos congênitos tornam-se cada vez mais raros, a estratégia usual é o uso da sorologia convencional na prevenção e quando a criança atinge 6 meses, bem como tratar imediatamente todos aqueles que apresentarem resultados positivos.

A apresentação adquirida é classificada em aguda e crônica. A fase aguda, mais frequente em crianças, tem como características o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação, que aparecem após 7 a 10 dias do contato com o inseto vetor. O período de incubação depende de vários fatores, no entanto, o tamanho do inóculo provavelmente seja o mais importante deles. O sinal de Romaña é um intumescimento unilateral das pálpebras e, quando encontrado, tem sido considerado patognomônico da doença. O primeiro sintoma/sinal observado no paciente chagásico é a febre. Outras manifestações clínicas eventualmente presentes são associadas a hepatomegalia, além de esplenomegalia, linfadenopatia, náuseas, vômitos, diarreias, inflamação e dor nos gânglios linfáticos, anorexia, irritação de meninges e edema subcutâneo. Estudos mostraram que a fase aguda permanece por cerca de 2 meses, desaparecendo mesmo na ausência de tratamento específico.

Logo após a fase aguda da doença, vem a intermediária, também chamada inaparente, latente ou subclínica. É a fase de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito, na qual o sistema

imunológico do paciente forma a resposta imunológica celular e humoral. Existe uma diminuição de parasitos na circulação do hospedeiro. O paciente não apresenta alterações patológicas significativas. O diagnóstico clínico é difícil e os testes sorológicos geralmente são positivos.

A fase crônica da doença de Chagas é classificada em cardíaca e digestiva.

Dos indivíduos infectados, em torno de 15% irão desenvolver a apresentação cardíaca da doença, caracterizada por miocardite crônica difusa. Nesse caso, geralmente são observadas alterações no eletrocardiograma convencional, na radiografia de tórax e no ecocardiograma. Testes sorológicos podem confirmar os achados clínicos.

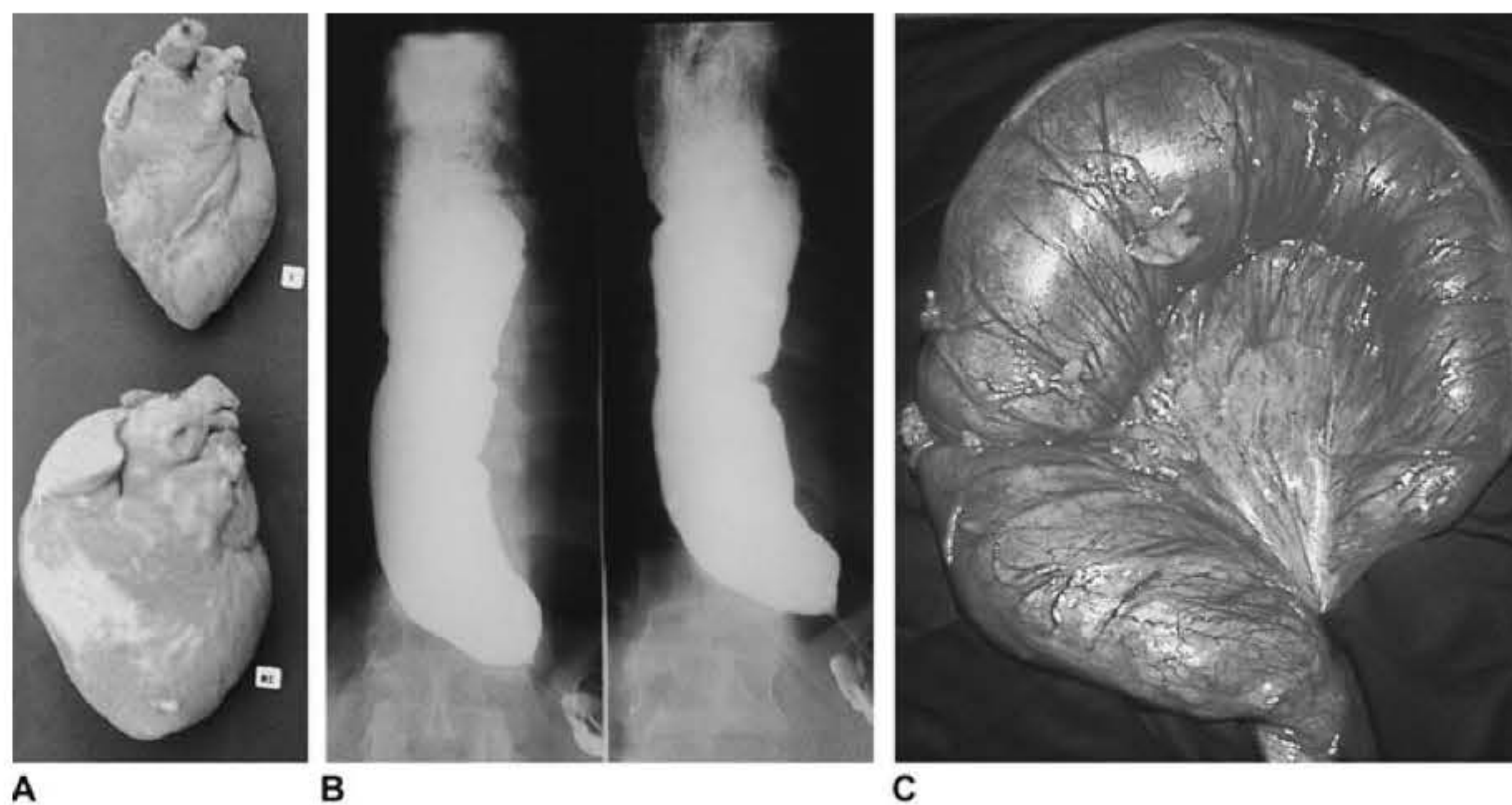
Na forma digestiva, o paciente pode apresentar alterações, como megaesôfago e megacólon. O exame radiológico contribui na definição do quadro clínico do paciente, e os testes sorológicos, principalmente a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, podem ser negativos, o que não exclui a etiologia chagásica. A Figura 22.3 mostra as alterações clínicas observadas na fase crônica da doença.

Do ponto de vista epidemiológico, a doença de Chagas é amplamente disseminada na América Latina. Estima-se que entre 12 e 14 milhões de pessoas estejam infectadas.

Segundo Dias (1992), mudanças de padrão sobre a prevalência, incidência e distribuição geográfica da doença devem-se às constantes migrações de populações em busca de melhores condições de vida, mudanças sociais e econômicas, programas de controle global e falhas no diagnóstico rápido da infecção chagásica. A extensão da área endêmica é de cerca de nove milhões de quilômetros, do México ao extremo sul da Argentina. A gravidade das formas clínicas da doença é maior na América do Sul, em áreas onde *T. infestans* e *R. prolixus* são os principais vetores.

Um fato importante que tem colaborado para que a doença de Chagas ocorra em países da América do Norte, Europa e Ásia é o intenso fluxo migratório ocorrido nos últimos anos de populações dos países latinos para países desenvolvidos, principalmente em busca de melhores condições de vida.

O Quadro 22.1 apresenta a estimativa de migrações de populações da América Latina para países desenvolvidos que ocorreram nos últimos anos. O que tem preocupado as autoridades sanitárias dos países que recebem os migrantes é a possibilidade da transmissão transfusional em bancos de sangue, uma vez que não existem critérios para selecionar os candida-



**Figura 22.3** Alterações clínicas nas formas crônicas da doença de Chagas. **A.** Forma cardíaca. **B.** Megaesôfago. **C.** Megacólon.



**Quadro 22.1 • Estimativa de migrações da América Latina para alguns países.**

Países	Estimativa
Canadá (2001)	131.135 (1.218 infectados)
Espanha (2000-2003)	339.954 (38.777 infectados)
Estados Unidos (1981-2005)	7.200.000 (56.000 a 357.205 infectados)
Austrália (2005-2006)	65.255 (1.067 infectados)

tos à doação para a infecção tripanossômica. Bancos de sangue dos EUA, país mais atingido, estão adotando rígidos critérios clínicos, epidemiológicos e sorológicos para selecionar os candidatos à doação de sangue.

## ► Diagnóstico de laboratório

O diagnóstico de laboratório da doença de Chagas é feito por métodos parasitológicos, radiológicos e por testes sorológicos.

### ▪ Diagnóstico parasitológico

Os métodos parasitológicos de diagnóstico podem ser utilizados nas fases aguda e crônica da doença.

Na fase aguda são utilizados *métodos diretos* para pesquisa de tripanossomos na corrente sanguínea e *indiretos*, como o xenodiagnóstico, que apresenta elevada sensibilidade. A pesquisa de tripanossomos pode ser feita por *microscopia direta*, na qual o sangue é examinado entre lâmina e lamínula durante as primeiras 6 semanas da doença. Variáveis do método direto, como a coloração de Giemsa, *gota espessa* ou a *concentração do sangue*, aumentam a probabilidade da detecção de baixas parasitemias. Uma variável promissora, o *Quantitative Buffy Coat* (QBC®), que tem sido indicado para pesquisa de plasmódios, foi aplicada com sucesso na pesquisa de tripanossomos, principalmente quando o nível de parasitemia é muito baixo. Vários autores referem a importância do método na pesquisa de tripanossomos em recém-nascidos com infecção congênita, em material de medula óssea, em pacientes cardíacos transplantados e em líquido cefalorraquidiano. A empresa responsável pelo desenvolvimento e comercialização no Brasil retirou esse produto do mercado após análise de custos, produção e revenda, os quais se mostraram inadequados para os países da América Latina. O *micro-hematócrito*, método simples que apresentou bons resultados na detecção de tripanossomos durante o surto de Santa Catarina, transmissão oral da doença de Chagas, apresenta níveis de sensibilidade superiores aos da microscopia direta. A *inoculação em peritônio de camundongo* e a *cultura* têm sido utilizadas como alternativas quando os métodos microscópicos falham. A sensibilidade desses métodos é muito baixa na fase crônica da doença. Nos pacientes imunocomprometidos, a pesquisa do parasito pode ser feita em outros fluidos biológicos ou tecidos. Tem sido descrita a presença de parasitos na medula óssea, cérebro, pele e linfonodos.

Deve sempre ser considerada a limitação dos métodos utilizados. Em geral, a sensibilidade do método direto é influenciada por inúmeros fatores que vão desde a qualidade da microscopia utilizada à capacitação técnica dos observadores, o que leva a variações de sensibilidade entre 50 e 95%.

Na fase crônica, são utilizados métodos indiretos, como o *xenodiagnóstico* e a *hemocultura*.

O *xenodiagnóstico* é feito com ninfas de vetores, criadas em laboratórios e alimentadas com sangue de aves refratárias à infecção por *T. cruzi*, que são colocadas para sugar diretamente o sangue do paciente. Cerca de 40 ninfas distribuídas em 4 caixas são utilizadas para sugar o sangue do paciente. Após o repasto sanguíneo, são mantidas no laboratório a 28°C com aproximadamente 85% de umidade. Após um período de 4 a 6 semanas, as fezes e os intestinos dos insetos, obtidos por esfregaço ou dissecação, são examinados por microscopia direta para pesquisa de *T. cruzi*. A sensibilidade do método é de cerca de 50% na fase crônica e de 85 a 100% na fase aguda.

O xenodiagnóstico artificial, *in vitro*, variável do método clássico, foi introduzido para evitar reações de hipersensibilidade em pacientes suscetíveis. Ninfas de vetores são colocadas para sugar o sangue dos pacientes suspeitos da infecção chagásica, colocado no interior de pequenos sacos, tipo de diálise, de várias procedências. O material mais utilizado na fabricação do saco coletor é uma membrana obtida a partir de intestino de porco. Vários autores referem que o exame após 30, 60 e 90 dias aumenta a positividade do teste na fase crônica da doença. Outro fator importante que aumenta a sensibilidade do teste na fase crônica da doença é a possibilidade de coleta de várias amostras de sangue do paciente suspeito de infecção chagásica em dias seguidos durante, preferencialmente, o pico febril – caso o paciente apresente febre. Adotando esse procedimento, o teste poderá apresentar sensibilidade superior a 90%, mesmo quando a parasitemia é muito baixa.

A hemocultura, embora limitada em sensibilidade, apresenta importância para isolar cepas responsáveis pelas infecções no homem e em animais, bem como para estudos de caracterização bioquímica e imunoquímica do parasito. Quando usada para diagnóstico, apresenta baixa sensibilidade, detectando cerca de 50% dos casos crônicos.

Outros métodos parasitológicos como a *inoculação em animais*, camundongos ou cobaias, e a *cultura de células in vitro*, são pouco recomendados para fins de diagnóstico.

A *reação em cadeia da polimerase* (*polymerase chain reaction* – PCR) é altamente sensível para detecção de DNA do parasito. Para a doença de Chagas, poderia representar importante procedimento nos casos com resultados sorológicos duvidosos. Em outras palavras, poderia ser utilizado como *gold standard test* na definição da etiologia chagásica. Vários pesquisadores têm estudado a padronização do método para ser aplicado na seleção de doadores de sangue, em inquéritos epidemiológicos ou para diagnóstico da infecção congênita. O tempo necessário para execução do teste, o alto custo e os falsos resultados positivos obtidos, decorrentes de contaminação ambiental, têm limitado a utilização do método para os propósitos referidos.

Em relação à sensibilidade da PCR, Sturm *et al.* (1989) detectaram 0,1% do genoma de um único parasito na presença de bilhões de DNA humanos, quando utilizaram um fragmento de cinetoplasto de *T. cruzi*. Maior sensibilidade foi obtida por Moser *et al.* (1989), detectando 0,05% de DNA do parasito, utilizando uma sequência repetitiva nuclear de DNA. Experimentalmente em camundongos, o método tem permitido a detecção de 8 a 10 parasitos em 100 µl de sangue.

Chiari (1999) comparou PCR com hemocultura e lise mediada por complemento na detecção da infecção por *T. cruzi* em indivíduos procedentes de diferentes regiões do Brasil, endêmicas ou não, e que apresentavam testes sorológicos positivos, negativos ou inconclusivos. A técnica foi capaz



de detectar um parasito íntegro ou 0,01% de fragmentos de DNA de *T. cruzi* circulando no sangue de indivíduos contaminados. O desempenho da PCR foi avaliado em 126 amostras de sangue de indivíduos provenientes de áreas endêmicas (113) e não endêmicas (13). O método foi positivo em 83,5% dos indivíduos com sorologia positiva, 47,6% dos casos com sorologia negativa e 46,2% dos casos com sorologia inconclusiva. Dos 10 indivíduos com PCR positiva e sorologia positiva, 8 apresentavam lise mediada por complemento positiva. No grupo controle, 100% das amostras foram PCR-negativas. Os resultados sugerem que a PCR poderia ser utilizada como critério de cura pós-terapêutica antitripanossomo e na seleção de doadores em bancos de sangue. Melhores avaliações poderiam consolidar essas sugestões.

Resultados promissores têm sido referidos por Constança Britto (2009) do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas da Fundação Oswaldo Cruz – IOC, comparando métodos moleculares, na busca de níveis elevados de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Atualmente, biólogos moleculares estão tentando normatizar o uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de Chagas para sugerir aos órgãos competentes sua produção, regulamentação e comercialização.

## ▪ Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos são amplamente utilizados na doença de Chagas para selecionar doadores em bancos de sangue, para acompanhamento da terapêutica antiparasitária, para fins sociais na seleção de trabalhadores, para confirmar ou excluir uma suspeita clínica e para inquéritos soropidemiológicos. O resultado do teste sorológico é de probabilidade e sua positividade ou negatividade é influenciada por fatores como a prevalência da doença, indicada por exames clínicos e dados epidemiológicos, a sensibilidade, a especificidade do teste e as condições imunológicas dos pacientes. Muitos testes têm sido padronizados e aplicados para os diferentes propósitos antes referidos.

É importante lembrarmos que o *T. cruzi* apresenta grande complexidade antigênica, o que influencia a resposta imunológica do hospedeiro e tem levado diversos pesquisadores, por meio da biologia molecular e da síntese de peptídeos, a procurarem antígenos, altamente sensíveis e específicos, que sirvam para a pesquisa de anticorpos, quando fixados a suportes inertes, ou para a pesquisa de antígenos circulantes, se utilizados na produção de anticorpos monoclonais. Ensaio com base na imunoprecipitação de antígenos proteicos marcados com substâncias radioativas e eletroforese têm fornecido resultados altamente específicos e sensíveis, abrindo a possibilidade de estudos sobre a composição imunoquímica do parasito, na busca de uma fração antigênica que possa servir como antígeno de referência para a padronização de um teste confirmatório da infecção chagásica com resultado sorológico duvidoso.

Stolf (1992) definiu como antígeno ideal aquele que deveria estar presente em todas as cepas isoladas de diferentes áreas endêmicas, não estar presente em outros agentes etiológicos de doenças infecciosas e parasitárias, ser altamente imunogênico, estável e facilmente obtido para utilização em testes sorológicos.

A seguir, faremos uma análise dos diferentes testes sorológicos utilizados no diagnóstico da doença de Chagas, lembrando que, ao diluir as amostras de soros e quantificar os resultados obtidos, observa-se imbricação nas curvas de reatividade de populações doentes e não doentes para os diferentes testes

sorológicos, devido à presença de anticorpos de grupo contra uma infinidade de determinantes antigênicos presentes geralmente em soros provenientes de populações de baixo nível socioeconômico, expostas a múltiplas infecções. Mudando-se o limiar de reatividade do teste, *cut-off*, obtêm-se índices de máxima sensibilidade ou de máxima especificidade que são utilizados de acordo com as aplicações práticas de cada teste. Assim, nos bancos de sangue, como são necessários testes de máxima sensibilidade, trabalha-se com limiares de reatividade baixos; e nos laboratórios clínicos, nos quais o resultado é utilizado para confirmar os achados clínicos dos pacientes ou para seguimento da terapêutica instituída, são empregados testes de máxima especificidade, o que se consegue aumentando o limiar de reatividade.

No ponto de encontro das curvas de reatividade existe um compromisso assumido para os valores de máxima sensibilidade e especificidade do teste.

## Fixação do complemento

Introduzida por Guerreiro e Machado em 1913, a reação de fixação do complemento apresenta hoje valor apenas histórico, embora existam centros especializados que se utilizam desse teste para fins de diagnóstico e triagem de doadores em bancos de sangue. A complexidade da técnica, associada a níveis baixos de sensibilidade e especificidade em relação a outros testes sorológicos, requer a padronização diária de seus componentes – antígeno, sistema hemolítico e complemento – o que influi na reprodutibilidade dos resultados do teste entre diferentes laboratórios.

Dos diferentes extratos antigênicos estudados, melhores resultados foram obtidos com o tratamento dos parasitos com benzeno/clorofórmio, benzeno, éter/clorofórmio e metanol.

Garcia *et al.*, trabalhando com um extrato antigênico obtido por extração alcoólica, descreveram um novo teste de fixação do complemento, com 92% de sensibilidade, 99% de especificidade e 97% de precisão e recomendaram sua utilização em laboratórios de pequeno porte em regiões de baixo poder aquisitivo.

## Precipitação

As variáveis técnicas do teste de precipitação, embora altamente específicas, são pouco sensíveis para fins diagnósticos. Destacamos sua utilização para a pesquisa dos diferentes componentes antigênicos de *T. cruzi*.

A contraímunoeletroforese tem sido utilizada por diferentes autores para diagnóstico e inquéritos epidemiológicos. Brenière *et al.* (1987), utilizando um imunossoro preparado em coelhos contra o antígeno conhecido como “fração cinco” de *T. cruzi*, obtiveram 85% de sensibilidade e 100% de especificidade, mesmo na presença de soros de pacientes com leishmanioses.

Requejo *et al.* (1991) padronizaram e avaliaram o teste DIG-ELISA, associação do teste imunoenzimático com a difusão em gel de ágar. Encontraram elevados índices de sensibilidade e especificidade e recomendaram o teste para triagem de pacientes chagásicos e para inquéritos epidemiológicos. Novas avaliações em diferentes centros deverão ser feitas para validação do teste.

## Aglutinação

As principais variáveis técnicas do teste de aglutinação, a direta e a indireta (hemaglutinação e aglutinação de partículas de látex), têm sido amplamente utilizadas no diagnóstico da doença de Chagas.



### Aglutinação direta

Vários autores descreveram a utilização da reação de aglutinação direta de parasitos e compararam os resultados com o teste de imunofluorescência.

Vattuone e Yanowsky (1971), utilizando uma suspensão de formas epimastigotas de *T. cruzi*, tratadas com enzimas e fixadas pelo formol, obtiveram boa sensibilidade na detecção de anticorpos na fase aguda da doença de Chagas.

Harith *et al.* (1987) padronizaram o teste de microaglutinação de formas epimastigotas de *T. cruzi*, tratadas com tripsina e coradas pelo Coomassie-Blue. O tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol foi fundamental para a eliminação de anticorpos inespecíficos presentes em baixos títulos e pesquisa de anticorpos específicos. Obtiveram altos índices de sensibilidade e especificidade.

Fator limitante no teste de aglutinação direta é o custo elevado pela quantidade de parasitos necessária para o preparo da suspensão antigênica e a frágil estabilidade do produto final obtido.

### Hemaglutinação

Trata-se de um teste amplamente utilizado para fins de diagnóstico, triagem e inquéritos soroepidemiológicos. Hemácias de mamíferos ou de aves previamente tratadas por aldeídos, como o formol, são sensibilizadas com componentes antigênicos de *T. cruzi*, parcialmente ou totalmente solubilizados. O produto liofilizado ou em suspensão apresenta excelente estabilidade, por longo período de tempo, mesmo em condições adversas de armazenagem e temperatura. O teste quantitativo ou qualitativo é feito em placas plásticas, normalmente utilizadas para microtitulação. Hemácias frescas, não tratadas com aldeídos, apresentam boa sensibilidade, quando sensibilizadas, na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, porém apresentam baixa estabilidade, mesmo quando conservadas em baixas temperaturas.

Diferentes extratos antigênicos de *T. cruzi* têm sido utilizados para sensibilizar as hemácias. O extrato antigênico alcalino, obtido por digestão dos parasitos com hidróxido de sódio, e o extrato obtido por sonicação de parasitos com solução tamponada de fosfatos são os que apresentam melhor desempenho na sorologia da doença de Chagas. O tratamento prévio dos soros com 2-mercaptoetanol aumenta a especificidade do teste.

O teste de hemaglutinação foi testado por Neal e Miles (1970), utilizando a cepa Y cultivada em meio de *liver infusion triptase* (LIT), em eluatos de sangue coletado em papel de filtro, de populações de diferentes países da América Latina. Não foram observadas diferenças regionais na resposta de anticorpos, dando a entender que o somatório de epitopos antigênicos presentes no parasito compensa eventuais variações antigênicas regionais.

O teste de hemaglutinação é recomendado para triagem de doadores de sangue por ser prático, de fácil manipulação e de baixo custo. O limiar de reatividade do teste deve ser determinado para cada serviço, principalmente em laboratórios de bancos de sangue que necessitam de testes com máxima sensibilidade. Atualmente, existem no mercado brasileiro *kits* bem padronizados de diferentes procedências, que atendem as exigências estipuladas pelas normas técnicas do Ministério da Saúde, conforme dados publicados após reunião patrocinada pelo Ministério.

Atenção especial deve ser dada a vários fatores que levam a falsos resultados positivos ou negativos nos testes de hemaglutinação:

- Estado de conservação dos microdiluidores em análises manuais ou automatizadas

- Placas com cargas eletrostáticas
- Homogeneização inadequada da placa
- Incubação das placas em baixas temperaturas
- Locais inadequados sujeitos a interferências ou vibrações
- Armazenagem indevida dos reagentes
- Soros com anticorpos de reações cruzadas (soros de pacientes com leishmanioses).

### Aglutinação do látex

Muito promissor, o teste de aglutinação de partículas de látex foi lançado no mercado brasileiro sem o cuidado de padronização adequada. Falsos resultados positivos e negativos foram encontrados, e a ausência de reprodutibilidade de diferentes lotes fez com que a empresa responsável pela sua produção retirasse o reagente do mercado. Atualmente, com a possibilidade de ligações covalentes entre componentes antigênicos de *T. cruzi*, obtidos por recombinação ou síntese e radicais químicos inseridos nas partículas de látex, abrem-se novas perspectivas de obtenção de um reagente reprodutível, estável, prático, de baixo custo e que forneça índices confiáveis de sensibilidade e especificidade.

### Imunofluorescência

O teste de imunofluorescência indireto normalmente é feito com formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, obtidas a partir de cultura em meio de LIT. Os tripanossomos formolizados são fixados em lâminas de vidro e incubados com o soro diluído, por 30 min, a 37°C. Após lavagens, as lâminas são incubadas com conjugado fluorescente (soro de carneiro ou cabra anti-IgG ou anti-IgM humanas marcado com isotiocianato de fluoresceína). Após incubação e lavagens, o preparado é analisado por microscopia de fluorescência. O teste de imunofluorescência para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* tem sido considerado como *teste de referência* na sorologia da doença de Chagas. A pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* tem valor significativo no diagnóstico da doença aguda.

Diferenças antigênicas são observadas nos diferentes estágios evolutivos de *T. cruzi*. Camargo (1988) encontrou títulos de anticorpos mais elevados com formas tripomastigotas do que com formas epimastigotas. Primavera *et al.* (1988) compararam formas epimastigotas com formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Concluíram que as formas amastigotas são mais reativas para detecção de anticorpos IgA anti-*T. cruzi*, principalmente em pacientes com a forma digestiva da doença. Esse achado foi importante para corroborar as observações feitas por Luquetti *et al.*, que encontraram casos de pacientes chagásicos, confirmados pelo xenodiagnóstico, com falsos resultados negativos na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, utilizando formas epimastigotas fixadas em lâminas de microscopia. Por serem muito reativas, as formas amastigotas podem apresentar resultados falso-positivos. Por isso, deve ser dada atenção especial ao limiar de reatividade do teste.

Levy (1991) padronizou o teste de imunofluorescência *in situ* com formas tripomastigotas para detectar epitopos de membrana. O teste mostrou-se útil para o acompanhamento das infecções persistentes, substituindo a reação de lise mediada por complemento com vantagens.

Diferentes fatores podem influenciar o resultado do teste de imunofluorescência – a qualidade da microscopia de fluorescência e dos antígenos utilizados, a diluição correta do conjugado fluorescente e o critério de leitura dos preparados obti-



dos são os principais e devem ser rigorosamente padronizados para obtenção de resultados confiáveis. Para se considerar uma reação positiva é necessário que toda a parede celular do parasito esteja fluorescente. Fluorescência pontilhada ao longo da parede pode significar que os parasitos estejam em processo de deterioração por umidade residual. Fluorescência de corpo indica uma reação inespecífica principalmente relacionada com a presença de outras patologias e anticorpos naturais.

Em relação ao limiar de reatividade do teste, na triagem sorológica em bancos de sangue, têm sido recomendados 1:20 e 1:40. Alguns serviços utilizam limiares mais baixos, o que contribui para o aparecimento de resultados falso-positivos. Cuidados adicionais, como o acompanhamento clínico dos doadores soropositivos, sem antecedentes chagásicos, têm sido recomendados para definição do verdadeiro quadro clínico do doador e evitar a sua marginalização pela sociedade.

Em laboratórios clínicos normalmente o limiar de reatividade utilizado é 1:40 para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. A Figura 22.4 mostra reações positiva e negativa de imunofluorescência indireta para anticorpos anti-*T. cruzi* com antígenos das formas epimastigota e amastigota.

#### Enzimaimunoensaio

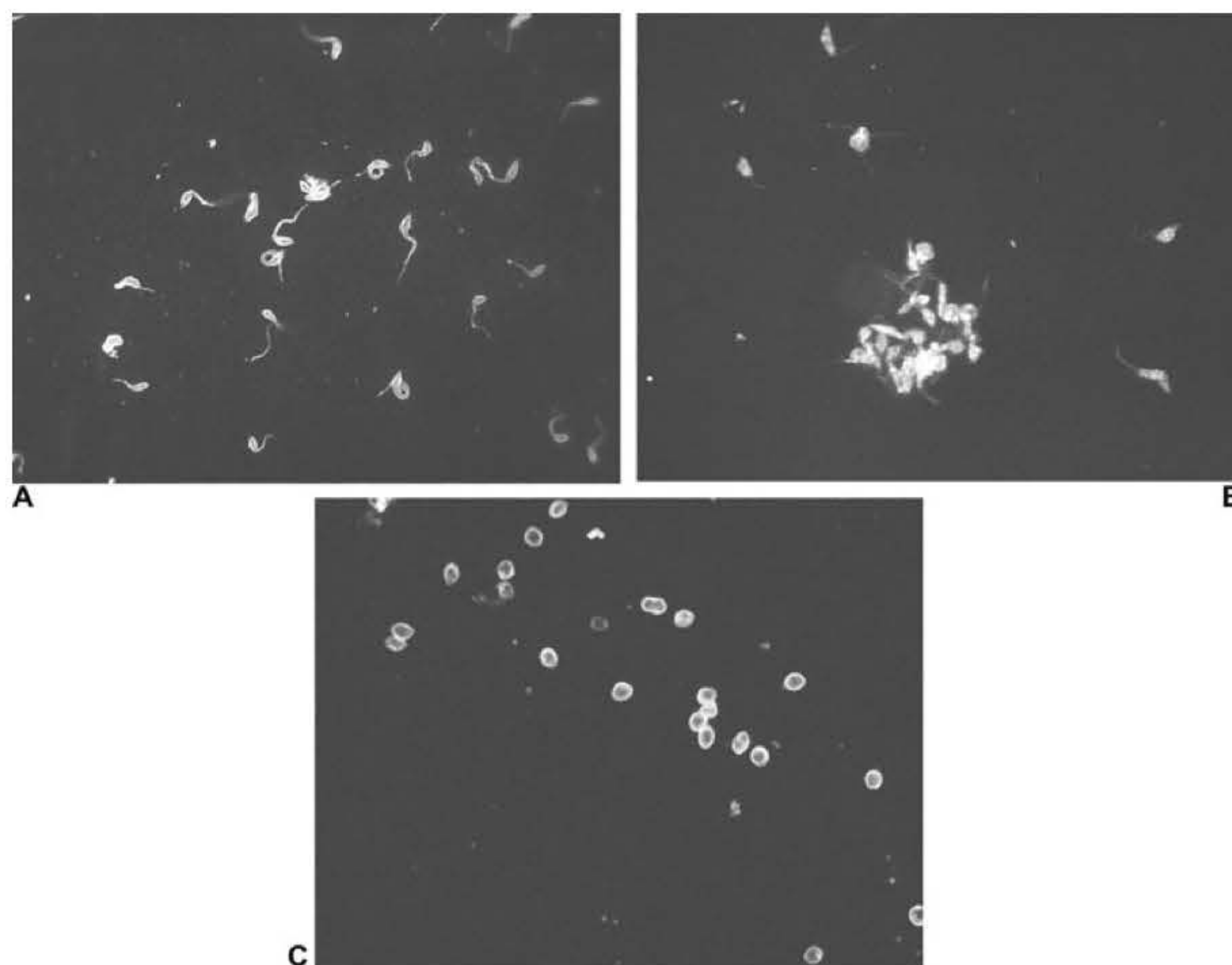
Ferreira, *et al.* (1975) descreveram a padronização e utilização do teste de imunoperoxidase no diagnóstico da doença de Chagas, utilizando formas epimastigotas de *T. cruzi*, formolizadas e fixadas em lâminas de microscopia como antígeno e conjugado enzimático (soro de carneiro ou cabra anti-IgG humana conjugado à peroxidase). Após incubação com soro diluído e conjugado, o complexo é revelado com substrato e doador de hidrogênio. O teste padronizado apresentou a mesma sensibilidade e especificidade observadas para o teste de imunofluorescência indireta. O aspecto prático é que a coloração resultante pode ser visualizada por microscopia óptica

comum, o que reduz consideravelmente o custo do teste. Por ser manual e de leitura subjetiva, o teste foi substituído por sistemas automatizados.

Voller *et al.* (1975) descreveram o teste imunoenzimático ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para o diagnóstico da doença de Chagas. O teste foi padronizado em placas de microtitulação, com componentes antigênicos solúveis de *T. cruzi* previamente adsorvidos. Após incubação com soro e conjugado enzimático, a reação é revelada com substrato e doador de hidrogênio que libera cor no sobrenadante. A intensidade da coloração, proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra, é avaliada por espectrofotometria.

O teste imunoenzimático padronizado abriu amplas perspectivas na sorologia da doença de Chagas, por ser sensível, específico, com leitura objetiva e passível de automação. A possibilidade de utilizar frações antigênicas definidas, obtidas por processos físicos e químicos, síntese ou biologia molecular, é um objetivo que está sendo investigado por diferentes pesquisadores em diferentes partes do mundo. A exemplo do teste de hemaglutinação, existem reagentes no mercado bem padronizados, para serem usados principalmente na triagem de doadores de sangue. Oelemann *et al.* (1999) fizeram um estudo para avaliar o desempenho de diferentes reagentes comerciais. Mostraram que, dependendo da área onde as amostras de sangue foram coletadas, a especificidade dos reagentes variou de 93,3 a 100%, a sensibilidade de 97,7 a 100% e a precisão de 93,6 a 100%. Nenhum dos reagentes comerciais apresentou índice de 100% para os parâmetros avaliados.

Uma das aplicações do teste imunoenzimático é a possibilidade da utilização de antígenos recombinantes ou peptídios sintéticos fixados na superfície de placas de microtitulação. Essa possibilidade poderá se tornar uma ferramenta importante no aprimoramento do diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Umezawa *et al.* (1999) testaram seis antígenos recombinantes no teste



**Figura 22.4** Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. **A.** Reação positiva utilizando como antígeno *T. cruzi* na forma epimastigota. **B.** Reação negativa utilizando como antígeno *T. cruzi* na forma epimastigota. **C.** Reação positiva utilizando como antígeno *T. cruzi* na forma amastigota.



imunoenzimático: H49, JL7, JL8, B13, A13 e 1F8 em 541 amostras de soros (304 de pacientes chagásicos e 237 amostras de indivíduos não chagásicos) provenientes de nove países: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, El Salvador, Venezuela, Guatemala e Honduras. A sensibilidade do ensaio variou de 93,4 a 99%, e a especificidade foi de aproximadamente 96%. Nesse estudo, usando formas epimastigotas do parasito, obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 84%. Foi sugerido que a associação de diferentes antígenos recombinantes poderia fornecer índices máximos de sensibilidade e especificidade, fato que precisa ser muito bem estudado. Por existirem no mercado *kits* bem padronizados com alta sensibilidade e especificidade superior a 99%, o Ministério da Saúde do Brasil publicou, em 2003, portaria normatizando a triagem em bancos de sangue e adotando como único teste de triagem o ELISA, de alta sensibilidade.

### Testes rápidos | Imunocromatográficos

A introdução dos testes imunocromatográficos na sorologia da doença de Chagas apresenta real importância quando se pensa que a patologia está disseminada pelo mundo e em locais de difícil acesso à medicina convencional. Testes imunocromatográficos com antígenos bem definidos estão sendo desenvolvidos por muitas empresas de biotecnologia e avaliados pela Organização Mundial da Saúde para serem registrados e comercializados em diferentes países. Dentre as principais vantagens dos testes rápidos, destacam-se: facilidade de manuseio, uso individual, rapidez, armazenamento a temperatura ambiente, mesmo em condições adversas, dispensa de equipamentos e possibilidade de ser feito em qualquer lugar, mesmo em locais remotos sem energia elétrica ou distantes de serviços de saúde. Dentre as desvantagens dos testes imunocromatográficos, destacam-se: o custo relativo por teste, a indefinição dos antígenos utilizados no suporte inerte, leitura subjetiva em soros de baixa reatividade, ausência de reprodutibilidade quando diferentes lotes são produzidos em larga escala. Como o objetivo do teste é a sua utilização na identificação de casos suspeitos ou na busca de casos ocultos em diversas partes do mundo, acredita-se que, com a participação de empresas de grande porte, em pouco tempo haverá no mercado produtos que atendam às exigências da sorologia em relação à sensibilidade, à especificidade e à reprodutibilidade.

### Western blotting como método suplementar para confirmar a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*

Diferentes laboratórios do mundo estão pesquisando um método que seja confirmatório da infecção chagásica. Dos diferentes procedimentos que estão sendo apresentados, o descrito por Umezawa *et al.* (1996) parece o mais realista para ser utilizado no diagnóstico da doença de Chagas. O método denominado *Tesa blot* é um *Western blotting* feito a partir de antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Trabalhando com amostras de sangue de pacientes chagásicos, formas congênita, aguda e crônica e de indivíduos não chagásicos, os pesquisadores encontraram 100% de sensibilidade e especificidade. O método também mostrou que, após a corrida eletroforética e transferência para fitas de nitrocelulose, os soros de pacientes crônicos e agudos reconhecem bandas diferentes. Na nossa experiência, o método foi capaz de resolver 80% dos casos considerados inconclusivos pela sorologia convencional (dados não publicados). Frade AF *et al.* (2010) utilizaram o método para confirmar a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em amostras de sangue colhidas em papel de filtro, como parte do inquérito sorológico realizado no Brasil entre 2002 e 2007 para conhecimento da prevalência sorológica de anticorpos em crianças de zero a 5 anos de todo o território nacional.

Recentemente, o *Western blotting* foi registrado na Anvisa com a denominação TESAcruzi, por bioMérieux Brasil, como método suplementar para confirmar a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* obtidos por testes convencionais, para ser comercializado no mercado nacional.

### Métodos para detecção de antígenos em fluidos biológicos

A detecção de antígenos de *T. cruzi* em fluidos biológicos apresenta enorme interesse na confirmação da infecção, principalmente quando os testes sorológicos e os métodos parasitológicos são negativos. Testes de precipitação, contraímunoeletroforese ou imunodifusão apresentaram sensibilidade limitada, mas mostraram-se altamente específicos, abrindo perspectivas para o diagnóstico confirmatório e prognóstico da doença. Os testes imunoenzimáticos de competição – ou duplo anticorpo – têm-se mostrado úteis na detecção de componentes antigênicos no sangue ou na urina, não apenas para o diagnóstico confirmatório, mas também para a avaliação de substâncias antiparasitárias. Alguns autores acreditam na importância da detecção de antígenos na urina para o diagnóstico da doença congênita.

Katzin *et al.* (1989) descreveram um teste de aglutinação rápida para pesquisa de antígenos em pacientes crônicos. Soro de cavalo anti-*T. cruzi* ligado a micelas de nitrocelulose reage com pequenas concentrações de antígenos presentes nos fluidos biológicos. Embora tenha sido encontrada elevada sensibilidade, melhores avaliações são necessárias.

Umezawa *et al.* (1993), utilizando um anticorpo monoespecífico contra o recombinante antigênico H49 em teste imunoenzimático e *Western blotting*, detectaram antígenos de 150 a 160 kDa em 60% das urinas de chagásicos crônicos. Não foram observadas reações inespecíficas com urinas de indivíduos-controle. Os autores discutem a possibilidade de correlacionar a presença desses antígenos a infecção ativa e suscetibilidade terapêutica, bem como a utilização do teste nos casos em que ocorrerem divergências dos resultados sorológicos.

## ► Padronização do diagnóstico de laboratório da doença de Chagas

A maior dificuldade na padronização do diagnóstico laboratorial da doença de Chagas está na característica individual dos testes utilizados para fins diagnósticos, pela possibilidade de falsos resultados positivos ou negativos. Nesse sentido, o Ministério da Saúde determinou em norma técnica de 1987 para os bancos de sangue a obrigatoriedade da execução de dois testes sorológicos de princípios diferentes na triagem dos doadores para doença de Chagas.

Durante muitos anos, os testes de hemaglutinação e imunofluorescência foram utilizados com sucesso para atender a norma do Ministério da Saúde. Quando são utilizados reagentes fabricados por empresas especializadas, poucos problemas são observados, e o risco de contaminação por transfusão é praticamente nulo. O problema ocorre quando são fabricados reagentes sem o conhecimento de *scalling up*, principalmente em laboratórios de pesquisa, onde a reprodutibilidade de resultados dos diferentes lotes do reagente é prejudicada pelo desconhecimento e pela falta de padronização das etapas da produção.

Atualmente, o teste imunoenzimático tem sido usado com vantagens nos laboratórios dos bancos de sangue, principalmente pela possibilidade de automação, o que limita os riscos de contaminação e agiliza a obtenção do resultado final. Erros humanos também são evitados pelo uso de sistemas totalmente automatizados.



Muitos laboratórios de bancos de sangue têm associado os testes de hemaglutinação e imunoenzimáticos na triagem inicial dos doadores, e os resultados discordantes são confirmados por imunofluorescência indireta, além da repetição dos testes mencionados.

Uma sugestão às normas técnicas que tem sido discutida atualmente é a possibilidade de utilizar, na rotina dos bancos de sangue, testes imunoenzimáticos com placas plásticas sensibilizadas com antígenos recombinantes ou sintéticos e com antígeno total do parasito. Com esse procedimento, os resultados teriam a especificidade definida pelos antígenos recombinantes e a sensibilidade definida pelo antígeno total.

A partir de 2003, os bancos de sangue, com base em norma técnica do Ministério da Saúde, passaram a realizar um único teste para a triagem da doença de Chagas. A norma informa que os bancos de sangue deverão utilizar um teste imunoenzimático de alta sensibilidade.

Um *Western blotting* como teste suplementar de uma sorologia positiva ou inconclusiva seria desejado. O TESAcruzi, conforme discutido anteriormente, por trabalhar com antígenos mais simples em faixa de gel bem caracterizada, parece ser uma boa alternativa para o diagnóstico confirmatório da doença de Chagas.

Em 2005, o Ministério da Saúde convocou uma reunião com mais de 40 pesquisadores especialistas em doença de Chagas para que se estabelecesse um consenso global sobre a patologia. No grupo de trabalho de diagnóstico foram sugeridos algoritmos para serem aplicados tanto na prevenção da doença congênita como no diagnóstico individual. As resoluções do consenso foram publicadas na *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Em 2010, foi feita uma revisão do consenso para ser adotado pelo Ministério da Saúde.

## ► Bibliografia

- Beck RJ, Shultz EK. The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Ann Pathol Lab Med* 1986; 110: 13-20.
- Brenière FS, Carlier Y, Carrasco R *et al.* Specific immunodiagnosis of Chagas disease: Immunodiffusion test using a specific serum anti-*Trypanosoma cruzi* component 5. *Tropical and Geographical Medicine* 1987; 281-286.
- Britto C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104: 122-135.
- Camargo ME. American trypanosomiasis (Chagas Disease). In: Jr WJ, Ohashi M *et al.* Laboratory Diagnosis of infectious Disease Principles and Practice. Balows A, Hausler Springer-Verlag: New York; 744-753, 1988.
- Camargo ME, Amato Neto V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1974; 16: 200-202.
- Camargo ME, Ferreira AW, Peres BA *et al.* *Trypanosoma cruzi* antibodies. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis* 1986; 11: 368-381.
- Camargo ME, Hoshino S, Siqueira GRV. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1973; 15: 81-85.
- Camargo ME, Souza SL. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1966; 8: 255-258.
- Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1999; 94(1): 299-300.
- Chiari E. Diagnostic Tests for Chagas' disease. Parasitological diagnosis. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rasi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil, p. 153-164, 1992.
- Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde Vol. 38 (Suplemento III), 2005.
- Coura JR. International Symposium on Advances in Knowledge of Chagas Disease 90 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1999; 94 (1): 432.
- Dias JCP. Epidemiology of Chagas Disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rasi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil, p. 153-164, 1992.
- Ferreira AW. Diagnostic tests for Chagas' disease. Serological diagnosis. Tests for Chagas disease serodiagnosis; A review. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rasi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil, 179-194, 1992.
- Ferreira AW, Belem ZR, Moura MEG *et al.* Aspectos da padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33: 123-128.
- Ferreira AW, Camargo ME, Nakahara OS. Aplicação do teste ELISA ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas. I. Estudo comparativo com o teste de imunofluorescência em amostras de sangue colhidas em papel de filtro. *Abstracts Congresso Internacional de doença de Chagas* 1979; p. 210.
- Ferreira AW, Camargo ME, Nakahara OS. *Trypanosoma cruzi*: Immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. *Experimental Parasitology* 1975; 37: 131-137.
- Frade AF, Luquetti AO, Prata A *et al.* Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. *Acta Trop* 2011 Jan; 117(1):10-3.
- Garcia E, Ramirez LE, Monteon V, Sotelo J. Diagnosis of american trypanosomiasis (Chagas'disease) by the new complement fixation test. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(4): 1034-1035.
- Harith AE, Laarman JJ, Minter-Goedbloed E *et al.* Trypsin-treated and coomassie blue-stained epimastigote antigen in a microagglutination test for Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 66-71.
- Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Nagasse TK. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1978; 20: 208-212.
- Katzin AM, Marcipar A, Freilij H *et al.* Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas Disease by agglutination test. *Experimental Parasitology* 1989; 68: 208-215.
- Levy AMA. Padronização e avaliação do teste de imunofluorescência com tripomastigotas fixados *in situ* na detecção de anticorpos indicadores da persistência da infecção em chagásicos crônicos. Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo, 1991.
- Luquetti AO. Use of *trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis. Multi-centre Trial. Serological and technical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1990; 85:497-505.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1477-1482.
- Neal RA, Miles RA. Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1970; 12: 325-332.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Peralta JM. Screening and confirmation in Chagas disease serology – A contribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1999; 94(1): 307-308.
- Primavera KSC, Hoshino-Shimizu S, Umezawa ES *et al.* Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26: 2101-2104.
- Requejo HIZ, Nakamura PM, Vaz AJ *et al.* Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) for Chagas' disease serodiagnosis. *Brazilian J Med Biol Res* 1991; 24: 471-483.
- Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1999; 94 (1): 93-101.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010 Jul-Aug; 115(1-2):14-21.
- Stolf AMS. Diagnostic tests for Chagas' disease. Serological diagnosis. *Trypanosoma cruzi* antigens for serodiagnosis. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME *et al.* Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil, 195-206, 1992.
- Sturm NR, Degraive W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33: 205-214.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME *et al.* Evaluation of recombinant antigens for Chagas disease serodiagnosis in South and Central America. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1554-1560.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr N *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2143-2147.
- Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. *Exp Parasit* 1993; 76: 352-357.
- Vattuone NH, Yanovsky JF. *Trypanosoma cruzi*: Agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. *Exp Parasitol* 1971; 30: 349-355.
- Voller A, Draper C, Bidwell DE *et al.* A microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. *Lancet* 1975; 1: 426-429.



## Capítulo 23

---

# Leishmanioses

*Luciana de Almeida Silva e  
Alda Maria da Cruz*

- Introdução, 278
- Diagnóstico da leishmaniose visceral, 278
- Diagnóstico da leishmaniose tegumentar, 280
- Bibliografia, 282



## ► Introdução

Leishmanioses são antroponoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. As formas visceral, cutânea e mucosa das leishmanioses resultam principalmente do tropismo das espécies por determinados sítios do organismo, mas também decorrem da interação entre a resposta imune do hospedeiro e o parasito. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: o *Leishmania*, que contém as principais espécies causadoras da leishmaniose visceral; e o *Viannia*, com as principais espécies causadoras da forma tegumentar.

As espécies envolvidas na etiologia da leishmaniose visceral humana (LVH) (também denominada calazar) no Velho Mundo são a *Leishmania (L.) infantum*, na região do Mediterrâneo, Ásia, China e norte da África, e a *L. (L.) donovani* no Sudão, Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal. No Novo Mundo, a *L. (L.) chagasi* é a mais frequente causa da doença. Alguns pesquisadores consideram a *L. (L.) chagasi* bastante semelhante à *L. (L.) infantum* e questionam sua classificação separada.

No Brasil, seis espécies são consideradas causadoras de leishmaniose tegumentar americana (LTA). Cinco pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawii*. Destas, a *L. (V.) braziliensis* é a principal, apresentando distribuição em todo território nacional. Na Região Norte do país (Amazonas, Pará, Amapá e Roraima), as demais espécies são também reconhecidas e com frequência variável. A representante do subgênero *Leishmania* com etiologia da LTA é a *L. (L.) amazonensis*, encontrada principalmente na bacia amazônica. Esta última espécie de leishmânia não é habitualmente viscerotrópica, mas, eventualmente, pode causar formas viscerais conforme a capacidade de o sistema imune hospedeiro interagir com o parasito.

Os estudos sobre imunopatogenia das leishmanioses contribuíram tanto para a compreensão do espectro clínico de apresentação da doença como para o aprimoramento dos testes empregados no seu diagnóstico. A resposta imune mediada por células T tem sido classificada principalmente em dois fenótipos: tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2). O fenótipo tipo 2 está mais associado à imunidade humoral, enquanto o tipo 1, à imunidade celular. Aplicando tal conceito às leishmanioses, constatou-se que as manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo indivíduo infectado. De modo geral, os casos de leishmaniose visceral clássica ou de leishmaniose cutânea difusa ocorrem naqueles indivíduos em cuja resposta imunológica predomina o componente tipo 2. Nesses casos, observa-se diminuição significativa na resposta imune celular efetora, com redução na proliferação de linfócitos T, decréscimo das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , predominância de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e ativação policlonal dos linfócitos B. Essa última seria responsável pela alta produção de imunoglobulinas, as quais são incapazes de eliminar a doença. Já os indivíduos com predomínio do componente tipo 1 conseguiriam limitar a doença, por elaborarem uma resposta celular efetiva, levando ao abortamento da infecção, conforme visto nas formas assintomáticas ou oligossintomáticas da leishmaniose visceral e na leishmaniose cutânea localizada. As principais linfocinas associadas a esse controle são IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12, juntamente com a ação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A capacidade do indivíduo de montar sua resposta imunológica protetora é influenciada por diversos fatores, como os ambientais, nutricionais e genéticos.

As áreas endêmicas de leishmanioses são frequentemente superpostas a áreas endêmicas de outras doenças tropicais. Destacam-se como diagnósticos diferenciais da leishmaniose visceral: malária, tuberculose, histoplasmose disseminada, esquistossomose, enterobacteriose septicêmica prolongada, dentre outras causas infecciosas. Ademais, cumpre ressaltar outras doenças não infecciosas que cursam com hepatoesplenomegalia febril, tais como as leucemias e linfomas. Para a apresentação tegumentar da doença, os principais diagnósticos diferenciais devem ser feitos com infecções fúngicas, bacterianas, inflamatórias e neoplásicas, sobretudo com esporotricose, impetigo, paracoccidiodomicose, carcinomas baso e espinocelular e úlcera angiodérmica. Dessa maneira, casos suspeitos devem ser confirmados por meio de investigação suplementar. A seguir serão detalhados os principais métodos empregados no diagnóstico das leishmanioses.

## ► Diagnóstico da leishmaniose visceral

### ▪ Diagnóstico clínico e epidemiológico

O diagnóstico da leishmaniose visceral humana (LVH) pode se basear em achados clínicos, laboratoriais inespecíficos, reações sorológicas e testes moleculares, porém, a confirmação da doença ocorre com a demonstração do parasito.

O primeiro passo da avaliação consiste em caracterizar a procedência do indivíduo e, por conseguinte, a frequência de casos de LVH no local de origem. No Brasil, houve um aumento progressivo no número de notificações da doença. No período de 1980 a 1990, a LVH havia sido registrada em 17 estados da federação, atingindo 4 regiões do país. Havia concentração de casos no Nordeste, com 93,1% das notificações, sendo que apenas 4 estados apresentavam 77,2% dos casos (Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão). Em contrapartida, de 2003 a 2007, 20 estados apresentaram notificação de casos autóctones de LVH, quantificando média de 3.187 doentes/ano, com incidência média de 2 casos/100.000 habitantes. Também caiu a concentração de casos na Região Nordeste para 62,5%, decorrente da expansão da doença nas Regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, as quais passaram de 15 para 44% dos casos. Além do aumento no número de casos notificados, observou-se a crescente urbanização da doença que tem ocorrido desde a década de 1970. Chama atenção a ocorrência de LVH em locais como Belo Horizonte (MG) e no estado de São Paulo, em áreas estritamente urbanas.

Com dados epidemiológicos compatíveis, a apresentação clínica pode direcionar ou não para o diagnóstico da doença.

Clinicamente, a LVH caracteriza-se pela tríade clássica de esplenomegalia, febre e palidez cutaneomucosa. A doença, em sua típica apresentação, tem período de incubação prolongado (2 a 8 meses), instalando-se progressivamente. O período inicial pode ser insidioso, marcado por febre baixa (até 38,5°C), perda do apetite, astenia e palidez progressiva, com possível esplenomegalia discreta. No período de estado, verifica-se persistência da febre, com instalação completa dos sintomas de astenia, emagrecimento, palidez cutaneomucosa e hepatoesplenomegalia. Alguns indivíduos apresentam sinais de hemorragia, sendo a epistaxe o mais comum, seguida de gengivorragia e petéquias. Finalmente, sem intervenção, a doença evolui para o período final, quando o paciente apresenta caquexia, anasarca e agravamento dos sinais e sintomas descritos. É frequente o surgimento de complicações bacterianas graves no paciente, como pneumonia e sepse, o que pode levá-lo ao óbito.

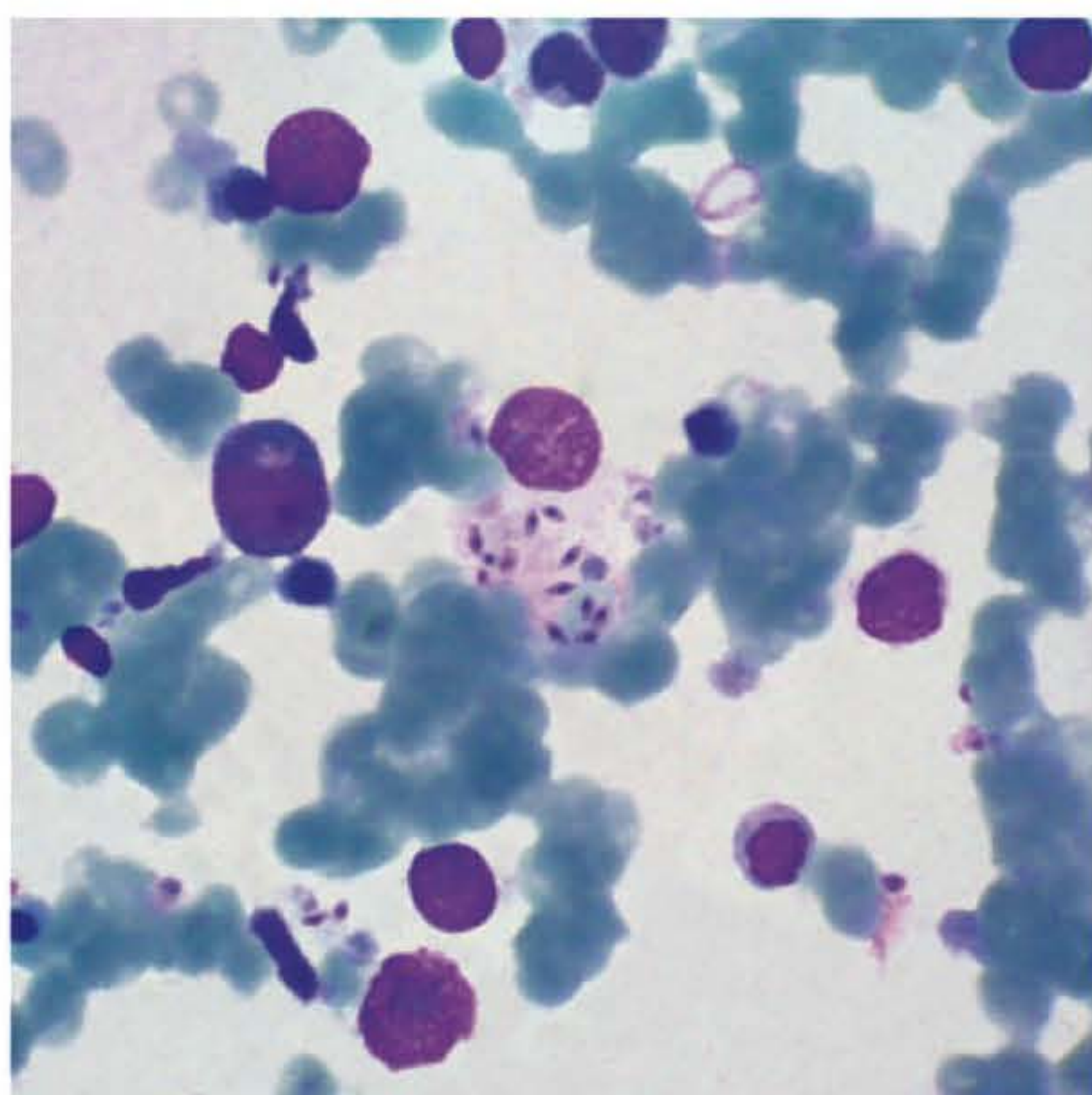


Quanto aos achados laboratoriais inespecíficos para o diagnóstico da leishmaniose visceral, observa-se pancitopenia. A anemia tende a ser normocítica/normocrômica, e a leucopenia ocorre principalmente devido à neutropenia, com frequente eosinopenia e linfocitose relativa. Observa-se hipoalbuminemia possivelmente multifatorial, como pelo consumo, depósito de imunocomplexos e acometimento hepático, havendo inversão da relação albumina/globulina. Sobre o sistema de coagulação, são relatados, além da plaquetopenia, aumento do tempo de protrombina. As enzimas hepáticas podem estar discretamente elevadas em alguns casos, bem como os níveis de bilirrubina, alterações associadas à evolução mais grave do caso.

### ■ Diagnóstico parasitológico

Os quadros clínico e laboratorial descritos, embora sugestivos, não são suficientes para uma definição diagnóstica adequada. Alguns exames complementares têm o propósito de encontrar o parasito com a punção de medula óssea ou esplênica que, associada à avaliação anatomopatológica do material, permite a visualização da *Leishmania* em cerca de 70 a 100% dos casos. A coloração mais frequentemente empregada para essa avaliação é o Giemsa (Figura 23.1). Obviamente, esses métodos dependem de um procedimento invasivo, o qual deve ser realizado por profissionais devidamente treinados. Os isolamentos por cultura do aspirado de medula ou do aspirado esplênico em meio NNN (Novy e McNeal modificado por Nicolle), LIT ou Schneider e a inoculação em *hamsters* buscam recuperar os parasitos viáveis. Entretanto, nem sempre se observa positividade, além da inconveniente demora para o crescimento e a identificação do protozoário.

A biologia molecular ganhou espaço progressivo no campo de diagnóstico das leishmanioses. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada um método indireto de avaliação de ocorrência do parasito, já que identificaria o DNA da *Leishmania*. Há vários formatos distintos de execução, os quais demandam variável complexidade de suporte laboratorial. Os ensaios de PCR convencional são os mais empregados nos casos de LVH, podendo ser realizada em sangue periférico, mas são



**Figura 23.1** Esfregaço de medula óssea contendo várias formas amastigotas de *Leishmania*. Cortesia do Prof. Luis Eduardo Ramirez.

observados melhores resultados quando são empregados aspirados de medula óssea ou esplênico. Alguns estudos demonstraram que tal técnica apresenta sensibilidade e especificidade variáveis, podendo chegar a quase 100% no diagnóstico dos casos humanos sintomáticos. Nos indivíduos imunossuprimidos, especialmente em portadores de AIDS, o diagnóstico da LVH por métodos sorológicos tem apresentado resultados insatisfatórios e a PCR tem sido considerada uma boa alternativa. O principal problema da PCR no diagnóstico da LVH é a ausência de estudos multicêntricos que validem os protocolos *in house* desenvolvidos em diversos centros de pesquisa.

### ■ Diagnóstico imunológico

Tendo em vista a ativação policlonal de linfócitos B que ocorre nos casos clássicos e o consequente aumento de imunoglobulinas reativas nesses pacientes, foram desenvolvidas reações sorológicas para identificar os anticorpos séricos. Os primeiros métodos empregados foram bastante inespecíficos e se baseavam na aglutinação de anticorpos do soro dos pacientes, decorrente do aumento das globulinas séricas (p. ex., reação de Napier, formol-gel). Era necessário o desenvolvimento de técnicas que pudessem diferenciar os isótipos de imunoglobulinas, detectando anticorpos antileishmânicos. A reação de fixação de complemento tentou alcançar esse objetivo. Os antígenos empregados eram divididos em dois grupos: antígenos inespecíficos, derivados de micobactérias, com boa positividade nos casos de calazar, mas que apresentavam grande percentual de reações cruzadas com outras doenças; antígenos extraídos da cultura de leishmânias, que apresentavam dificuldades no preparo de quantidades maiores do material, além de não terem evidenciado melhor desempenho em relação aos inespecíficos.

Com os problemas referentes à aplicabilidade da fixação de complemento em áreas endêmicas com outras doenças e em grande escala, essa técnica foi progressivamente substituída pela reação de imunofluorescência indireta (IFI). Em 1964, Duxbury e Sadun e Shaw e Voller descreveram essa técnica no diagnóstico da leishmaniose visceral, demonstrando a boa sensibilidade do método. Nesses primeiros trabalhos, já foram observados problemas quanto à especificidade, devido às reações cruzadas frequentes com doença de Chagas e leishmaniose mucosa, além das ocasionais com malária, esquistossomose e hanseníase. Seguiram-se estudos buscando aperfeiçoar a técnica por meio da adequação do antígeno e dos valores de diluição. A IFI foi então padronizada e considerada como método convencional de diagnóstico por apresentar alta sensibilidade, persistindo como boa alternativa até hoje. Entretanto, a especificidade da técnica não alcançou igual desempenho, devido às reações cruzadas, especialmente com doença de Chagas. Isso traz dificuldade diagnóstica quando existe superposição das áreas endêmicas das duas doenças.

Buscando novas técnicas para a sorologia, seguiram-se experimentos utilizando a ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) com antígenos de promastigota *L. (L.) donovani* e, posteriormente, de *L. (L.) infantum*, que apresentaram alta positividade nos casos de calazar e baixo número de reações cruzadas com outras doenças endêmicas. Essa especificidade não se confirmou em outros trabalhos, principalmente devido às reações positivas com doença de Chagas e leishmaniose cutânea e mucosa, que ocorriam, em geral, com baixos títulos. Os problemas quanto à especificidade pareciam estar relacionados com a seleção da espécie de *Leishmania* e com a preparação do antígeno para a reação. Comparada com a IFI, a técnica de ELISA apresentou sensibilidade semelhante, com



maior facilidade operacional. Assim, o método ELISA com antígeno de promastigota também foi considerado como bom método convencional, sendo aplicado para diagnóstico da leishmaniose visceral em áreas endêmicas. Todavia, apresenta ainda limitações quanto à sua especificidade.

Nesse contexto, vários antígenos têm sido propostos para uso da técnica ELISA. O antígeno K39 foi desenvolvido com o objetivo de aumentar a especificidade dos exames, sem perder em sensibilidade. Recebeu a denominação K39 por conter 39 aminoácidos repetidos, os quais são parte de uma proteína (cinesina), comum às leishmânias *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi*. O produto recombinante (rK39) foi empregado como antígeno para a técnica ELISA e também impregnado em fita imunocromatográfica. Esses métodos exibiram sensibilidade e especificidade acima de 90% no diagnóstico de LVH por diversos pesquisadores no Brasil, China, Sudão, Paquistão, Turquia e Índia. Entretanto, o desempenho do rK39 não foi tão satisfatório em resultados obtidos no norte de Minas Gerais, com apenas 69,4% de sensibilidade na técnica ELISA, e no Sudão, dois estudos mostraram 49% e 57% de sensibilidade no teste imunocromatográfico.

Na tentativa de padronizar um método sorológico que pudesse ser empregado com maior facilidade em áreas endêmicas, foi desenvolvido o teste de aglutinação direta (DAT). Os pesquisadores envolvidos na padronização da técnica caracterizaram-na como econômica, de fácil execução e com resultados comparáveis aos tradicionais IFI e ELISA. Avaliações posteriores confirmaram o desempenho adequado do DAT no diagnóstico de leishmaniose visceral, mas foram levantadas outras limitações, como a duração da estabilidade do preparado antigênico e, por conseguinte, sua aplicabilidade em áreas endêmicas. Assim, os estudos realizados no sentido de melhorar a estabilidade antigênica resultaram no desenvolvimento do antígeno liofilizado, que não necessitaria de refrigeração e teria desempenho semelhante ao aquoso. Estudos recentes têm comparado o desempenho do DAT ao obtido com testes usando o rK39. No Brasil, pesquisadores padronizaram a produção de antígeno para o DAT obtido a partir de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, alcançando resultados promissores.

Dentre os métodos para detecção de anticorpos, também tem sido empregado o *Western blotting* (WB). Constatou-se grande número de bandas superpostas em amostras de *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensi* e *Trypanosoma cruzi*. Por conseguinte, vários pesos moleculares de antígenos foram propostos para o diagnóstico de infecção por leishmaniose. Para *L. (L.) infantum* os pesos moleculares mais empregados foram os descritos por Mary *et al.* de 14 kDa ou 16 kDa, mas também existem publicações evidenciando outros pesos com sensibilidade e especificidade adequadas, tais como 63 kDa, 70 kDa e 94 kDa.

A situação não é diferente com a *L. (L.) chagasi*, para a qual se observa ampla variação de antígenos reconhecidos como definidores. As primeiras descrições enfocaram um antígeno com peso de 63 kDa (provavelmente relacionado com a proteína de superfície da leishmaniose denominada GP63) chegando a 100% de sensibilidade e especificidade no WB. Outros estudos, porém, não demonstraram esse desempenho, sendo então sugeridos outros pesos moleculares, como 30 kDa e 70 kDa. Considerando as publicações revisadas até o momento, observa-se que existem bandas predominantes dependendo das espécies, sem uniformidade entre elas, e que não as diferenciam. Dessa maneira, a aplicabilidade do WB tem sido restrita ao campo da pesquisa.

Mesmo com o avanço na caracterização de novos antígenos e na produção de recombinantes, tem sido difícil a determinação da fase do processo infeccioso em que se encontra o indivíduo sorologicamente positivo. A presença de anticorpos antileishmânicos poderia indicar um contato antigo com o parasito. Na tentativa de evidenciar infecção ativa, foram estudados os antígenos liberados por *L. donovani* em meio de cultura livre de proteínas. Os chamados “exoantígenos solúveis” (Ld-ESM) foram utilizados em ensaios com as técnicas ELISA e WB para validação com casos clássicos de calazar e controles negativos, cujos resultados mostraram sensibilidade superior a 95% e especificidade de 100%. Ainda são poucos os estudos publicados que empregam esse tipo de antígeno. Os resultados iniciais mostraram bom desempenho do teste com exoantígenos desse grupo, no entanto, não foram reprodutíveis em novos lotes de kits produzidos comercialmente.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) avalia a hipersensibilidade cutânea tardia e depende da resposta imune celular frente a antígenos de *Leishmania*. Como essa resposta está suprimida nos pacientes com leishmaniose visceral clássica, tal reação não é útil para o diagnóstico da doença. Após o tratamento, habitualmente a IDRM torna-se positiva, indicando uma recuperação da resposta imune celular do indivíduo.

Segundo o Ministério da Saúde, os métodos de diagnóstico recomendados na rotina são os testes sorológicos IFI e ELISA com antígenos de promastigota e a busca do parasito por meio da punção de medula óssea. Como a punção de medula é um procedimento médico, dificilmente realizado em áreas endêmicas com poucos recursos, a sorologia tem sido o método complementar mais empregado na rotina diagnóstica.

O Quadro 23.1 resume os achados de sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos diagnósticos para leishmaniose visceral.

## ► Diagnóstico da leishmaniose tegumentar

### ▪ Diagnóstico clínico e epidemiológico

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) se baseia em critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. É fundamental determinar se o indivíduo é proce-

**Quadro 23.1 - Sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos diagnósticos para leishmaniose visceral.**

	Sensibilidade	Especificidade
<b>Exames parasitológicos</b>		
Pesquisa direta	60 a 95%	100%
Cultura	66 a 78,4%	100%
<b>Reações sorológicas</b>		
IFI	83,3 a 98%	93 a 100%
ELISAp	50 a 100%	75 a 100%
ELISA rK39	70 a 98%	98 a 100%
Teste rápido rK39	80 a 100%	49 a 100%
DAT	91 a 100%	72 a 100%
<b>Métodos moleculares</b>		
PCR	70 a 96%	99 a 100%

ELISAp = ELISA bruto de promastigota



dente de área endêmica. A doença é registrada em todos os estados, sendo que no Norte e Nordeste são notificados 80% dos casos. O padrão epidemiológico varia de acordo com a região, mas o processo de urbanização tem modificado o perfil de transmissão da tipicamente florestal para peridoméstico e doméstico. É importante a observação de animais com afecção de pele e comprometimento do estado geral, sobretudo os cães, pois constituem o principal reservatório doméstico da infecção. A doença tem um período de evolução variável, em geral de 1 a 3 meses, podendo chegar a 1 ano. Todas as espécies dermatrópicas de *Leishmania* causam leishmaniose cutânea (LC). A maioria dos pacientes apresenta lesão cutânea única, geralmente localizada em regiões descobertas do corpo. Entretanto, o paciente pode apresentar várias lesões (geralmente 2 a 10), as quais podem evoluir mesmo com lesões múltiplas ou disseminadas. A lesão ulcerada é a mais frequente, mas o aspecto dermatológico pode ser bastante variado e mesmo atípico. A evolução tende a ser benigna e pode apresentar cura espontânea. Quando há, concomitantemente, o acometimento de mucosa, denomina-se leishmaniose mucocutânea (LMC), apresentação que se diferencia clinicamente da leishmaniose mucosa (LM). Cerca de 3 a 5% dos casos de infecção por *Leishmania* podem evoluir para a forma mucosa (LM), sendo esta primordialmente causada pela *L. braziliensis*. Essa forma surge, em média, até 5 anos após a infecção inicial, aparente ou não. A mucosa orofaríngea é a mais frequentemente acometida. A evolução é bem mais lenta que na LC, podendo levar à destruição da face. A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma apresentação bastante rara, na qual os indivíduos parasitados pela *L. amazonensis* desenvolvem lesões múltiplas, do tipo nodular, com riqueza parasitária.

Apresentações clínicas pouco comuns podem decorrer da associação com a infecção pelo HIV, como lesões disseminadas, localizações atípicas, síndrome de recuperação imune-inflamatória, acometimento visceral por espécies dermatrópicas e até apresentações dermatológicas por espécies viscerotrópicas. Entretanto, mesmo na vigência de imunossupressão grave, há indivíduos que desenvolvem apresentações clínicas típicas. É recomendado oferecer a sorologia anti-HIV nos casos em que há indicativos dessa associação. As recidivas e a resistência ao tratamento são frequentes. Embora a introdução dos antirretrovirais tenha modificado a história natural da doença, ainda é crescente o número de casos que têm sido registrados.

Atualmente, reconhece-se que, a despeito da semelhança entre a infecção pelas diferentes espécies, existem particularidades na apresentação clínica da leishmaniose causada pelas diferentes leishmânias. Isso ocorre provavelmente em virtude de mecanismos imunopatogênicos específicos de cada relação com as espécies de parasito-hospedeiro, implicando em diferenças no diagnóstico, tratamento, evolução e prognóstico da leishmaniose.

### ▪ Diagnóstico parasitológico

A confirmação do diagnóstico se dá por meio da demonstração do parasito nos tecidos acometidos. A positividade é maior nas lesões recentes (menos de 3 meses de evolução) e varia de acordo com a técnica empregada, com as condições de manuseio da amostra e com a apresentação clínica. Os parasitos estão normalmente presentes na LC, são mais difíceis de serem observados na LM, embora sejam abundantes na LCD. A biópsia e/ou o raspado devem ser realizados na borda da

lesão, região de maior atividade da infecção, ou onde houver processo inflamatório na região mucosa.

O fragmento obtido por biópsia deve ser fracionado e submetido aos seguintes procedimentos:

- Impressão em lâmina, para posterior coloração
- Acondicionamento em salina estéril com antibióticos para posterior cultivo em meio NNN
- Acondicionamento em formol 10% tamponado para análise histopatológica
- Coleta em frasco virgem para pesquisa de DNA de *Leishmania* por PCR.

O parasito é mais difícil de ser detectado nas infecções por *L. braziliensis* em comparação com as provocadas por *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. A visualização dos parasitos por exame direto é menos frequente e a positividade vai depender da experiência do examinador. O material para tal análise pode ser obtido no raspado da borda da lesão, com posterior esfregaço em lâmina (Figura 23.2). O isolamento do parasito em cultivo pode ter êxito em torno de 60 a 70% casos. Os isolados devem ser enviados para caracterização da espécie por técnicas de isoenzimas e reconhecimento por anticorpos específicos. A histopatologia também permite a definição do padrão do infiltrado, sendo caracteristicamente do tipo inflamatório granulomatoso com presença de linfócitos, macrófagos e histiócitos, que, embora não seja um padrão característico da leishmaniose, é bastante sugestivo da doença.

A PCR é a metodologia que apresenta maior positividade (acima de 90%), devendo-se fazer a ressalva que essa técnica evidencia o DNA do parasito, não se podendo afirmar com precisão se há ou não presença do organismo vivo. Atualmente, a técnica de PCR em tempo real traz a possibilidade de quantificar o parasito nos tecidos. Outras técnicas que permitem a visualização de antígenos do parasito no tecido incluem a imunoperoxidase e a imunofluorescência.

### ▪ Diagnóstico imunológico

O teste intradérmico para a avaliação da hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro ou leishmanina) é o mais amplamente empregado nos serviços de saúde para diagnóstico da LC. Apesar de a utilização da IDRM ser muito antiga e ampla, ainda não há uma padronização ade-



**Figura 23.2** Raspado de lesão sugestiva de leishmaniose cutânea. Cortesia do Prof. Alan César Teixeira.



quada no teste, bem como uma definição precisa de seu valor preditivo nesse diagnóstico. O antígeno (solução contendo promastigotas de *Leishmania*) é aplicado na face anterior do braço esquerdo, a leitura é realizada em 48 h e são considerados positivos aqueles que apresentarem área de enduração igual ou superior a 5 mm (Figura 23.3). A positividade indica que o indivíduo teve contato com antígenos de *Leishmania*, não sendo possível precisar se foi recente ou precoce. Portanto a IDRM pode ser positiva em indivíduos assintomáticos e naqueles que se curaram da doença, além de produzir reação cruzada com outras infecções, por exemplo, a doença de Chagas. A sensibilidade e a especificidade do teste variam entre 82 e 100%. O diâmetro da enduração tende a ser maior na LM do que na LC, e o teste caracteristicamente é negativo na LCD.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pode ser realizada por reação de imunofluorescência e ELISA, havendo ainda a possibilidade de se utilizar *Western blot*. O ELISA é um teste sensível, com o qual podem ser detectadas IgG, IgM e, mais recentemente, isótipos de imunoglobulinas vêm sendo estudados como marcadores de prognóstico. No entanto, os títulos costumam ser baixos e a positividade fica em torno de 50%, sendo bem maior na LM e na LCD, em comparação com a LC. Os títulos tendem a ser mais elevados nas fases mais iniciais da LC e nos casos graves. No entanto, a positividade também depende da espécie envolvida, sendo os títulos mais baixos na infecção por *L. guyanensis*. Quando positiva, a sorologia também pode ser utilizada para controle de cura, já que a negatificação dos títulos é associada à cicatrização das lesões e ao bom prognóstico.

Nos pacientes coinfectados com HIV, os parasitos são mais abundantes nos tecidos e, portanto, o diagnóstico parasitológico frequentemente detecta a leishmânia. Entretanto, o uso de medicações fungicidas e até mesmo de determinados antirretrovirais pode ter ação sobre a leishmânia, não levando à cura, mas reduzindo a capacidade de detecção desses organismos.

A maioria das unidades de atendimento não dispõe desses procedimentos laboratoriais, na prática e, sobretudo, nas localidades onde não são realizados métodos laboratoriais específicos para detecção de infecção por *Leishmania* e, por isso, o diagnóstico é firmado pela história epidemiológica, pelas características clínicas da lesão e pela positividade do teste de Montenegro. No entanto, sempre que possível, o material biológico deve ser enviado a um dos centros de referência do Ministério da Saúde para confirmação do diagnóstico de leishmaniose.



**Figura 23.3** Enduração resultante na intradermoreação de Montenegro em paciente com leishmaniose cutânea. Cortesia do Prof. Luis Eduardo Ramirez.

## ► Bibliografia

- Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of National Academic of Sciences*, v. 90, 1993; p. 775-779.
- Chappuis F, Rijal S, Soto A *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *British Medical Journal*, v. 333, 2006; p. 723-728.
- Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose tegumentar americana. In: Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005; p. 697-712.
- Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S *et al.* Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Tropical Medicine and International Health* 2008; 13(11): 1378-1383.
- Duxbury RE, Sadun EH. Flurescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1964; 13: 525-529.
- Evans TG, Pearson RD. Identification of leishmanial antigens in the sera of patients with American visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 1988; 56(12).
- Harith EA, Kolk AHJ, Kager PA *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986; 80(4): 583-536.
- Hommel M, Peters W, Ranque J *et al.* The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1978; 72(3): 213-218.
- Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Coinfecção *Leishmania*-HIV. 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília. 1ª edição atualizada. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_hiv.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_hiv.pdf).
- Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília. 2ª edição atualizada. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf) (Acesso em 07.02.2010).
- Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília. 1ª edição, 120 p.
- Marques da Cunha A, Dias E. Sur la préparation d'un antigène stable pour la réaction de fixation du complément dans les leishmanioses. *Comptes Rendus Societe Biologie*, 1938; 129: 991-993.
- Mary C, Lamouroux D, Dunan S *et al.* *Western blot* analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-KD and 16-KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 47(6): 764-771.
- Oliveira E, Pedras MJ, Assis IEM *et al.* Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009; 103: 1279-1281.
- Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H *et al.* Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *Journal Clinical of Microbiology* 1994; 32(3): 746-749.
- Prata A, Silva LA, Calazar. In: Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005; p. 713-732.
- Reed SG, Badaró R, Lloyd RMC. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *The Journal of Immunology* 1987; 138(5): 1596-1601.
- Romero HD, Silva LA, Silva-Vergara, ML *et al.* Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; 81(1): 27-33.
- Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GHR *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 48(3): 1037-1043.
- Shaw JJ, Voller A. The detection of circulating antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1964; 58(4): 349-352.
- Souza WJS, Coutinho SG, Marzochi MCA *et al.* Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1982; 77: 247-253.
- Zijlstra EE, El-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan: 3. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2001; 95 (suppl. 1): 27-58.



## Capítulo 24

---

# Malária

*Sandra do Lago Moraes,  
Silvia Maria Di Santi e  
Maria Carmen Arroyo Sanchez*

- Introdução, 284
- Diagnóstico clínico, 286
- Diagnóstico de laboratório, 286
- Malária transmitida por transfusão, 295
- Conclusão, 296
- Referências bibliográficas, 297



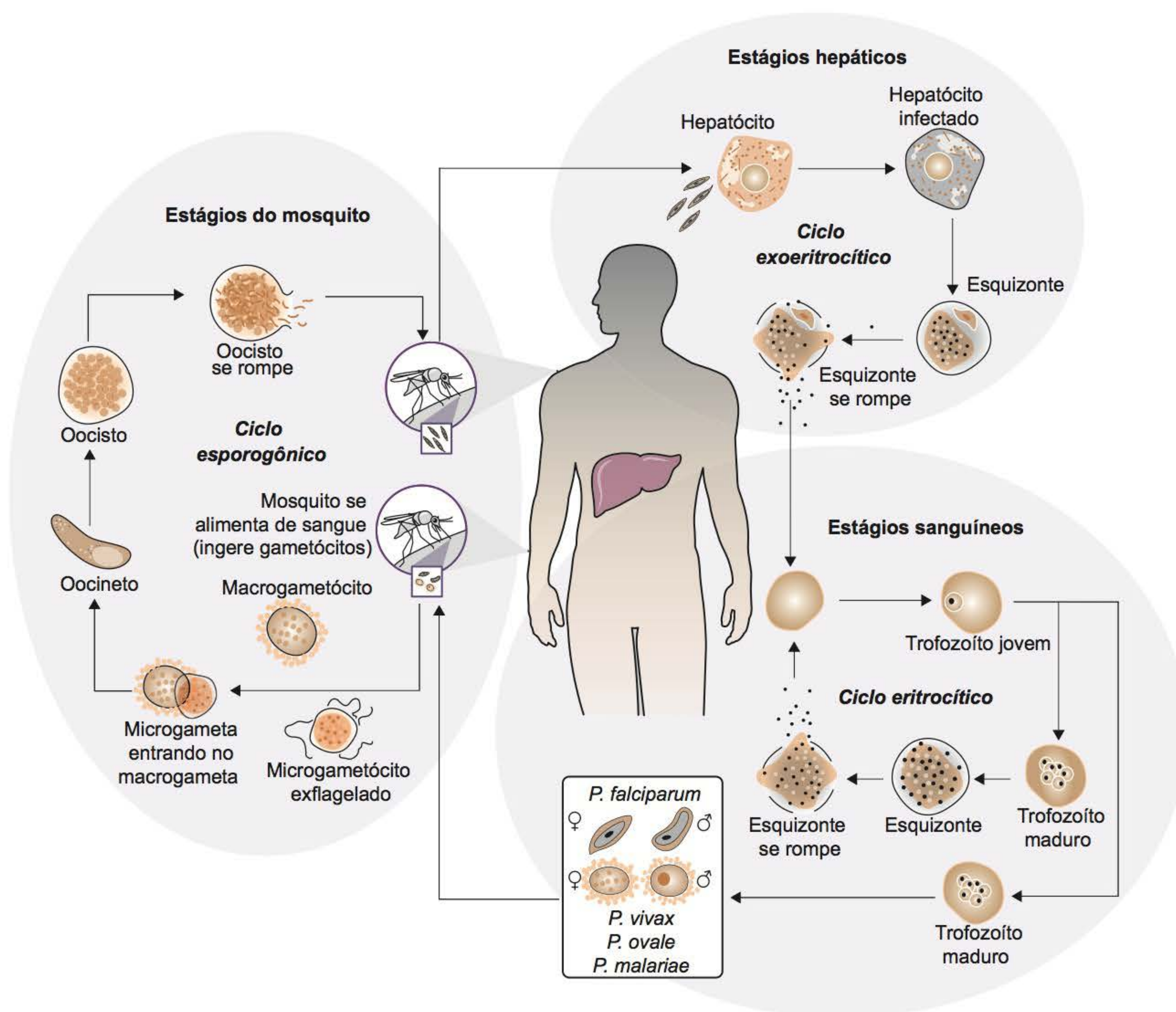
## ► Introdução

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, da família Plasmodiidae, filo Apicomplexa, que infectam alternadamente um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. O gênero *Plasmodium* foi definido com base no ciclo de vida do parasito, com uma fase de reprodução sexuada seguida por três fases de reprodução assexuada, sendo que a fase sexuada (fertilização) ocorre no estômago, e a primeira assexuada (esporogonia), no epitélio do estômago e corpo do mosquito *Anopheles*; as outras duas fases ocorrem em um hospedeiro vertebrado, a segunda acontece nas células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exoeritrocítica) e a terceira no sangue, onde se repete muitas vezes (esquizogonia eritrocítica) (Figura 24.1).<sup>1</sup>

Quando a fêmea de *Anopheles* se alimenta de sangue infectado com gametócitos, os gametas machos e fêmeas livres iniciam o processo de fertilização, produzindo um zigoto, o qual se desenvolve em uma forma invasiva, o oocineto; este caminha para a parede do estômago transformando-se em um oocisto. Com o início da esporogonia, o oocisto cresce e se divide, produzindo milhares de esporozoítos invasivos, que

migram pela hemolinfa do mosquito e invadem as glândulas salivares. A fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula os esporozoítos no sangue do hospedeiro vertebrado, e esses invadem rapidamente os hepatócitos, transformando-se em trofozoítos hepáticos, que amadurecem e sofrem várias divisões, produzindo milhares de merozoítos. Os hepatócitos se rompem liberando os merozoítos na circulação, iniciando o *ciclo eritrocítico*. No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos podem originar os hipnozoítos, que são parasitos latentes nos hepatócitos e que podem se desenvolver meses ou anos mais tarde, causando as conhecidas recaídas da doença. No ciclo eritrocítico ocorre nova divisão assexuada, os merozoítos se desenvolvem em trofozoítos que amadurecem, dividem-se várias vezes e formam os esquizontes. Os esquizontes maduros levam à ruptura da hemácia que libera merozoítos capazes de reinfetar novas hemácias. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos machos e fêmeas, que amadurecem sem divisão celular e se tornam infectantes aos mosquitos.<sup>1</sup>

Existem aproximadamente 120 espécies de plasmódios. Cinco espécies são infectantes para o homem: *P. vivax* (Grassi e Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. mala-*



**Figura 24.1** Ciclo de vida do *Plasmodium*.



*riai* (Laveran, 1881), *P. ovale* (Stephens, 1922) e *P. knowlesi* (Knowles e Gupta, 1932). *P. vivax*, a espécie mais amplamente distribuída, ocorre em zonas tropicais e temperadas, predominando na Ásia, América Latina e algumas partes da África. *P. falciparum*, com distribuição mundial, predomina na África e Sudeste Asiático. *P. ovale* é encontrado principalmente no oeste da África e nas ilhas do Pacífico Ocidental, *P. malariae* é encontrado nas mesmas regiões que *P. falciparum*, só que em menor frequência. *P. knowlesi* foi implicado mais recentemente como causador de malária em humanos na Malásia.<sup>2,3</sup> No Brasil, ocorrem predominantemente as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* e, com menor frequência, *P. malariae*.

Apesar de a malária ser uma doença cuja história está intimamente relacionada com a própria história da humanidade, continua sendo a maior endemia do mundo e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações.<sup>4</sup> Diversos fatores, como resistência do mosquito aos inseticidas, resistência do parasito às medicações, mudanças climáticas, sociais, políticas e econômicas (crise energética, inflação, guerras e instabilidades políticas) e ausência de vacinas que confirmam proteção por longo período levaram ao aumento de malária em diversas áreas tropicais. Esses fatores, associados a movimentos populacionais não controlados e distúrbios ecológicos, concorrem para que a doença seja, ainda hoje, uma das principais ameaças à saúde. Segundo dados de 2009, a África detém 78% dos casos e 91% dos óbitos por malária, mas a globalização da doença é um fato que preocupa também as autoridades dos países desenvolvidos, pois casos de malária transfusional e malária importada por migração e viagens são relatados em diferentes partes do mundo.<sup>5,6</sup> Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou recentemente sucessos na luta contra a malária no mundo, e que se tornaram possíveis graças ao envolvimento de parcerias, tanto de órgãos governamentais como não governamentais. Estima-se que o número de casos anuais de malária, que havia aumentado de 233 milhões em 2000 para 244 milhões em 2005, voltou a diminuir para 225 milhões em 2009. Os

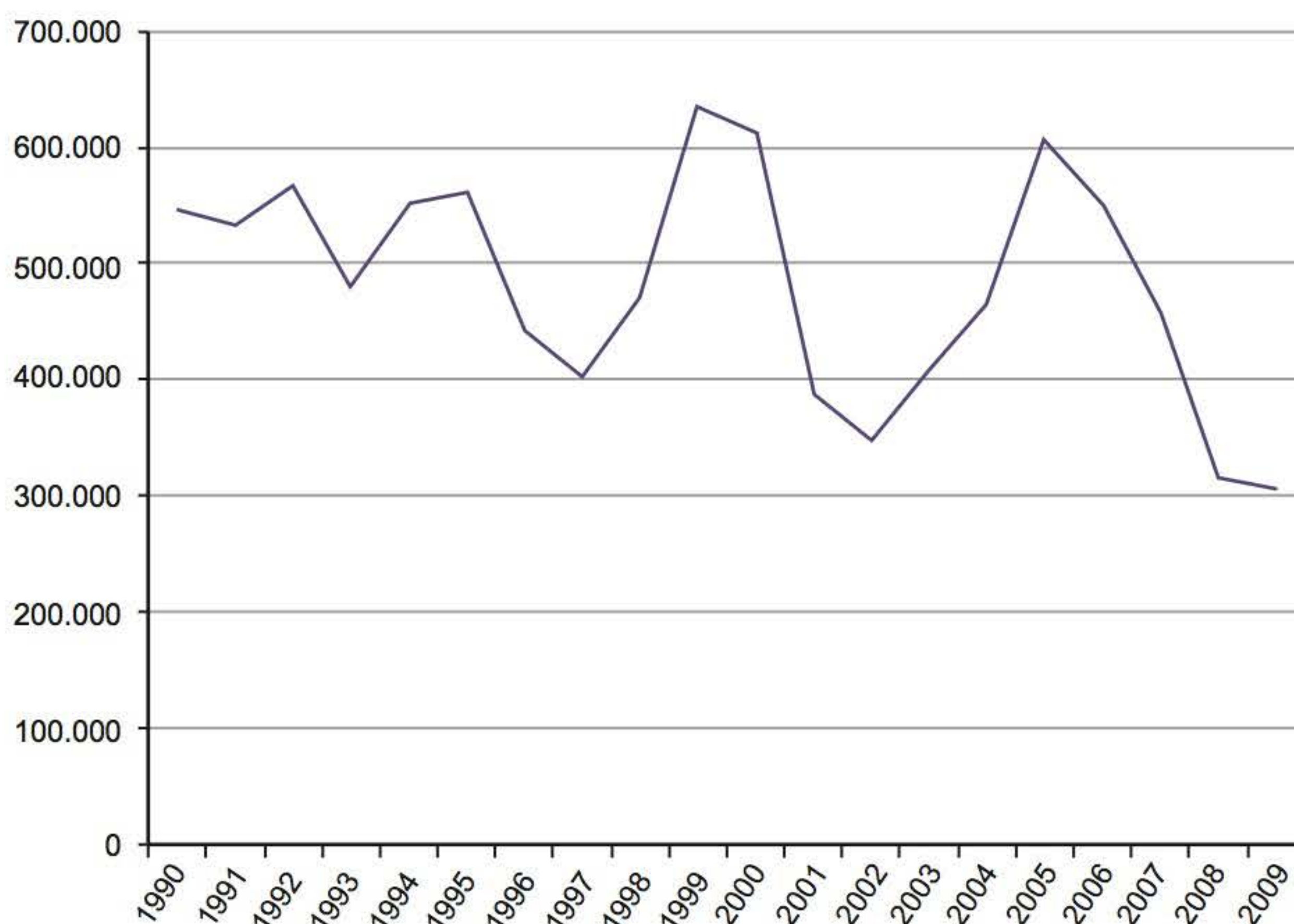
106 países endêmicos para malária alcançados pela OMS têm conseguido não apenas diminuir o número de casos da doença como os problemas causados por ela, com exceção de Ruanda, São Tomé e Príncipe e Zâmbia.<sup>4</sup>

No Brasil, 500 mil novos casos foram relatados por ano, em média, na década de 1990. De 2000 a 2002, medidas de controle eficazes conseguiram diminuir o número de casos, mas estes voltaram a aumentar gradualmente e chegaram a quase 600 mil em 2005. Desde então, novas medidas de controle foram implementadas e a incidência da doença voltou a diminuir, com cerca de 300 mil casos relatados, tanto em 2008 como em 2009 (Figura 24.2).<sup>7</sup>

Ao longo das três últimas décadas, a OMS lançou inúmeros programas de controle da malária no mundo, que, em geral, estabeleceram elementos básicos a serem aplicados a qualquer local, independentemente das condições existentes, como:

- Diagnóstico precoce e tratamento rápido
- Planificação e implementação de medidas preventivas e seletivas, incluindo o controle do vetor
- Detecção, controle e prevenção de epidemias
- Reforço da capacidade local em pesquisa básica e aplicada aliada a uma avaliação regular da situação da malária em nível nacional.

O objetivo atual é diminuir em 75% ou mais a mortalidade causada pela malária até 2015, a qual, em 2009, chegou a 781 mil mortes.<sup>4</sup> Para tanto, é imprescindível que se mantenham ações sustentadas e vigilância, pois o controle da doença é frágil e requer a manutenção dos programas mesmo quando o número de casos tenha diminuído substancialmente (como foi observado no Brasil em vários períodos [Figura 24.2]). Os focos para atingir o alvo de diminuir a mortalidade são acesso aos mosquiteiros impregnados com inseticidas ou *sprays* inseticidas residuais para o interior dos domicílios por todas as pessoas que residam em áreas de risco e disponibilidade de diagnóstico laboratorial para todos os casos suspeitos com tratamento efetivo dos casos confirmados. Os avanços no controle são anima-



**Figura 24.2** Casos confirmados de malária no Brasil – 1990 a 2009. Adaptada de Portal da Saúde, Malária, Ministério da Saúde. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab\\_casos\\_confirmados\\_malaria\\_bra\\_gr\\_e\\_ufs\\_90a09.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_confirmados_malaria_bra_gr_e_ufs_90a09.pdf).



dores, pois a cobertura mundial de mosquiteiros impregnados com inseticidas nos domicílios aumentou rapidamente, chegando a 42% em alguns países da África até a metade de 2010. A porcentagem de casos suspeitos testados laboratorialmente aumentou de 67% em 2005 para 73% em 2009. Porém, muitos casos ainda são tratados sem o diagnóstico laboratorial, principalmente na África, onde 21 de 42 países endêmicos testam menos de 20% dos casos suspeitos. Também 77 de 86 países endêmicos para *P. falciparum* têm uma política de tratamento com terapia combinada à base em artemisinina para os casos confirmados de malária não complicada por este parasito. O tratamento de malária por *P. vivax* é feito com cloroquina, no qual esta é efetiva, ou com uma combinação apropriada em áreas onde existe resistência de *P. vivax* à cloroquina. Ainda, o tratamento de *P. vivax* deve ser associado a 14 dias de primaquina para prevenir as recaídas da doença.<sup>4</sup>

Os métodos de laboratório são ferramentas importantes no esforço de se controlar a doença, seja na prática clínica (diagnóstico individual ou seguimento da eficácia da terapêutica antimalárica), em estudos epidemiológicos ou na triagem de doadores de sangue.

O diagnóstico precoce é um elemento crucial para o controle da infecção, e, ao se abordar esse tema, deve-se ter em mente a importante associação dos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A adequação dos métodos diagnósticos a serem aplicados em uma região pode ser determinada por fatores decorrentes desses aspectos, como:

- Nível de endemicidade
- Prevalência e tipo de resistência às medicações
- Facilidades de acesso ao local
- Características socioeconômicas
- Infraestrutura de saúde existente
- Ferramentas diagnósticas disponíveis.<sup>8</sup>

Tomemos como exemplo duas situações extremas de propagação de malária: regiões com altas taxas de transmissão e regiões com taxas baixas ou moderadas de transmissão.

O desenvolvimento gradual de imunidade com fases bem definidas é observado nas regiões com altas taxas de transmissão, como na África, ao sul do Saara. Até os dois primeiros meses de vida, as crianças apresentam proteção parcial, provavelmente devido à transferência de anticorpos maternos e à persistência de hemoglobina fetal. A partir daí, começam a apresentar sintomas clínicos de malária e altos níveis de parasitemia (cerca de 2%), evoluindo para malária grave e letal.<sup>9</sup> Por volta dos 5 anos de idade as crianças começam a desenvolver imunidade antitóxica, que é a diminuição das manifestações clínicas da doença, mesmo com altas densidades parasitárias. De 20 a 25% dos adultos, com exceção de gestantes, tendem a ser altamente imunes e assintomáticos. Essa imunidade adquirida não é esterilizante e não impede repercussões clínicas, como linfoma de Burkitt, baço hiper-reativo da malária e doenças sanguíneas genéticas. Nessas regiões predomina o *P. falciparum*. O tratamento deveria ser feito precocemente, em nível primário de saúde, mas não existem facilidades diagnósticas. Há pouca disponibilidade de microscópios e de pessoal técnico treinado, além de dificuldades no sistema de eletricidade, o que faz com que muitas vezes o diagnóstico de malária seja feito exclusivamente pelos critérios clínicos. Portanto, um teste diagnóstico aplicável nessas regiões poderia ser *P. falciparum*-específico, no entanto deveria ser um teste simples, rápido, seguro, que não necessitasse de energia elétrica, estável e barato. A disponibilidade desse diagnóstico iria auxiliar no controle da mortalidade e morbidade e solucionar o problema

do uso indiscriminado de antimaláricos, mas não iria controlar a transmissão, a população ainda estaria sujeita às repercussões clínicas da malária e os indivíduos não imunes e crianças manteriam-se sujeitos às apresentações graves da doença.<sup>10</sup>

Áreas com baixas ou moderadas taxas de transmissão, como o Sudeste Asiático, China e muitas áreas da América do Sul, especialmente a Bacia Amazônica, apresentam outras características. A transmissão é altamente focal, limitada a regiões de florestas e rios, onde áreas alagadas causadas por degradações podem levar à formação de criadouros e focos; sazonal, alcançando picos no início e novamente seguindo o fim das estações chuvosas; a população de alto risco compõe-se de trabalhadores em contato com a floresta, como os agricultores, seringueiros, construtores de estradas, garimpeiros e populações que vivem em áreas ribeirinhas. Ocorre diversidade de espécies envolvidas, sendo *P. falciparum* e *P. vivax* as mais comuns. Em função dessa instabilidade na transmissão da malária, a população em geral é não imune (com casos de doença clínica em adultos jovens acometendo principalmente homens, provavelmente pela exposição ocupacional) e muitas infecções se tornam graves e complicadas. Os sintomas da doença podem surgir antes de a parasitemia ser detectável microscopicamente, e qualquer parasitemia, mesmo muito baixa, pode implicar doença. Um teste aplicável nessas regiões deveria ser capaz de detectar baixas parasitemias (inferiores a 100 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue) e diferenciar todas as espécies de malária prevalentes.<sup>10</sup>

## ► Diagnóstico clínico

Os sintomas da malária envolvem mal-estar, cefaleia, dores musculares, náuseas e tonturas, seguidos de uma sensação de frio, acompanhada de tremor, febre (com náusea e vômitos), suor e aumento da temperatura. Esse quadro clássico pode ser alterado pelo uso de fármacos profiláticos ou pela aquisição de imunidade, sendo que muitos desses sintomas podem ou não estar presentes e até mesmo todos podem estar ausentes. Nos casos complicados, podem ocorrer dores abdominais fortes, sonolência, redução da consciência e até coma, como na malária cerebral. A falta de parâmetros clínicos isolados que permitam o diagnóstico confiável da malária justifica a necessidade de outros métodos diagnósticos que confirmem a infecção.<sup>1,11</sup>

## ► Diagnóstico de laboratório

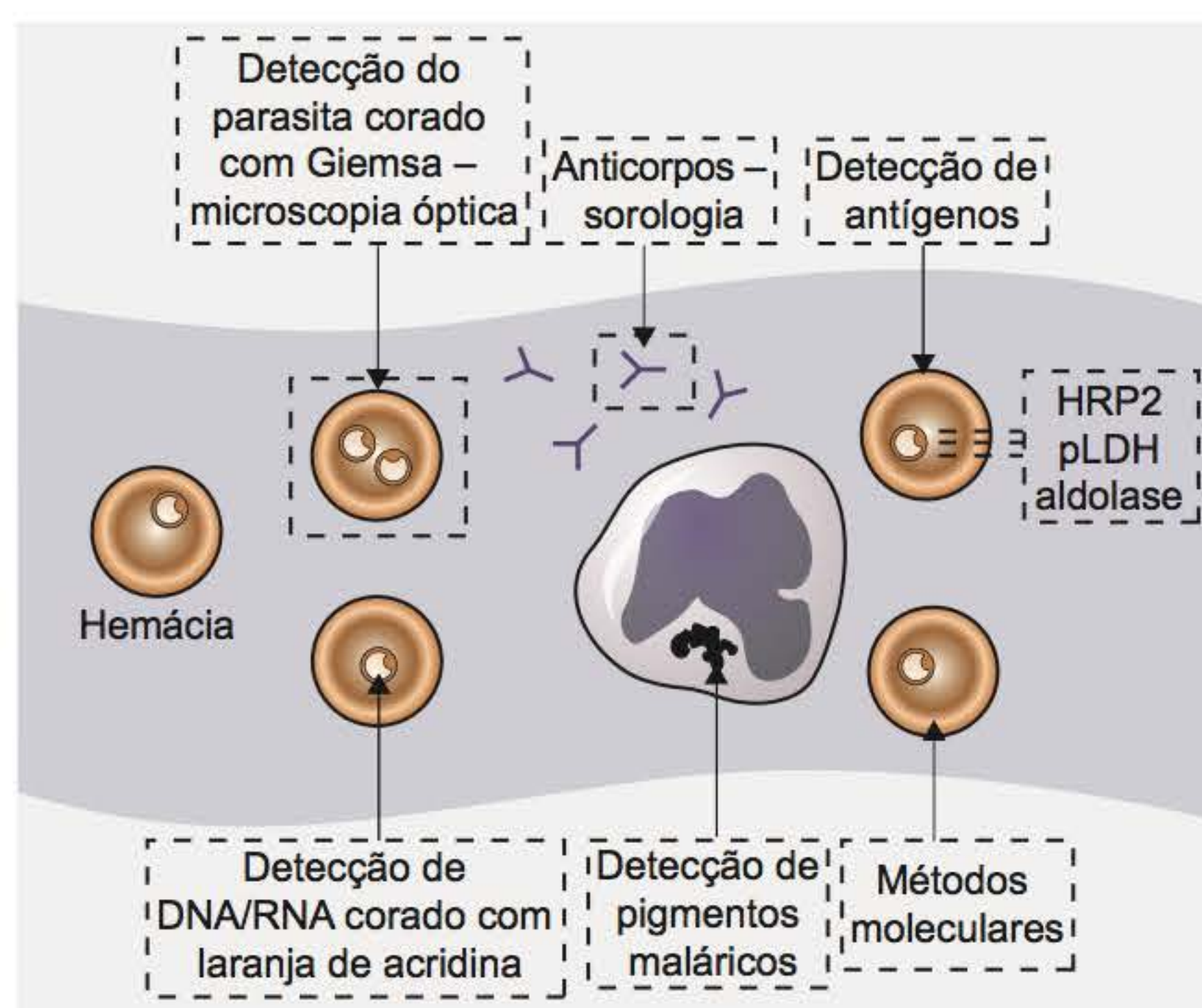
Muitos métodos de laboratório têm sido desenvolvidos e avaliados quanto à sua aplicabilidade em:

- Prática clínica para o diagnóstico individual, triagem de doadores de sangue e acompanhamento de pacientes em tratamento específico
- Estudos epidemiológicos para avaliar infecções passadas e atuais em populações
- Assessoramento da suscetibilidade a fármacos
- Avaliação do estado imune de indivíduos e populações.

Conforme esquema da Figura 24.3, os métodos de laboratório se baseiam na detecção de:

- Plasmódios nas hemácias
  - Microscopia óptica: gota espessa e/ou esfregaço; coloração de DNA/RNA do parasito em tubo capilar-QBC®; microscopia com fluorocromos





**Figura 24.3** Esquema dos diferentes alvos dos métodos diagnósticos da malária. Adaptada de Hanscheid, 1999.<sup>12</sup>

- Métodos moleculares: DNA ou RNA do plasmódio no sangue
- Antígenos de plasmódios em fluidos biológicos – imunofluorescência, ensaios imunoenzimáticos; testes rápidos ou imunocromatográficos
- Anticorpos específicos antiplasmódios no soro – imunofluorescência indireta, em ensaios imunoenzimáticos etc.

Considerando o aparecimento de marcadores diagnósticos (parasito/antígenos/anticorpos) em uma primoinfecção na malária, podemos simplificadamente dividi-la em cinco períodos (Quadro 24.1):

- Em um período de aproximadamente 2 dias após o início da infecção patente, dispondo de um método de alta sensibilidade, pode-se detectar plasmódios nas hemácias
- De 2 a 7 dias, antígenos de plasmódios são detectados nas hemácias ou circulando no soro
- Em um período extremamente variável, podem ser detectados os anticorpos antiformas eritrocitárias, sendo que, em muitos casos, não são detectáveis
- De 10 a 30 dias após um tratamento eficaz, não são mais detectados plasmódios nas hemácias, mas alguns antígenos podem ainda ser detectados na circulação
- Em um quinto período, muito variável (de meses a anos) ainda podem ser detectados anticorpos específicos antiplasmódios na circulação.

Portanto, analisando essa evolução, quando o objetivo é o diagnóstico precoce, como na prática clínica ou em triagem de doadores de sangue, os métodos de laboratório de escolha

**Quadro 24.1** - Evolução simplificada de antígenos de *P. falciparum* e anticorpos anti-*P. falciparum* durante a primoinfecção.

Período	I	II	III	IV	V
Antígenos					
Sangue total	+	+	+	–	–
Soro	–	+	+	+	–
Anticorpos	–	–	+	+	+
Duração aproximada	2 dias	2 a 7 dias	Variável	10 a 30 dias	Meses

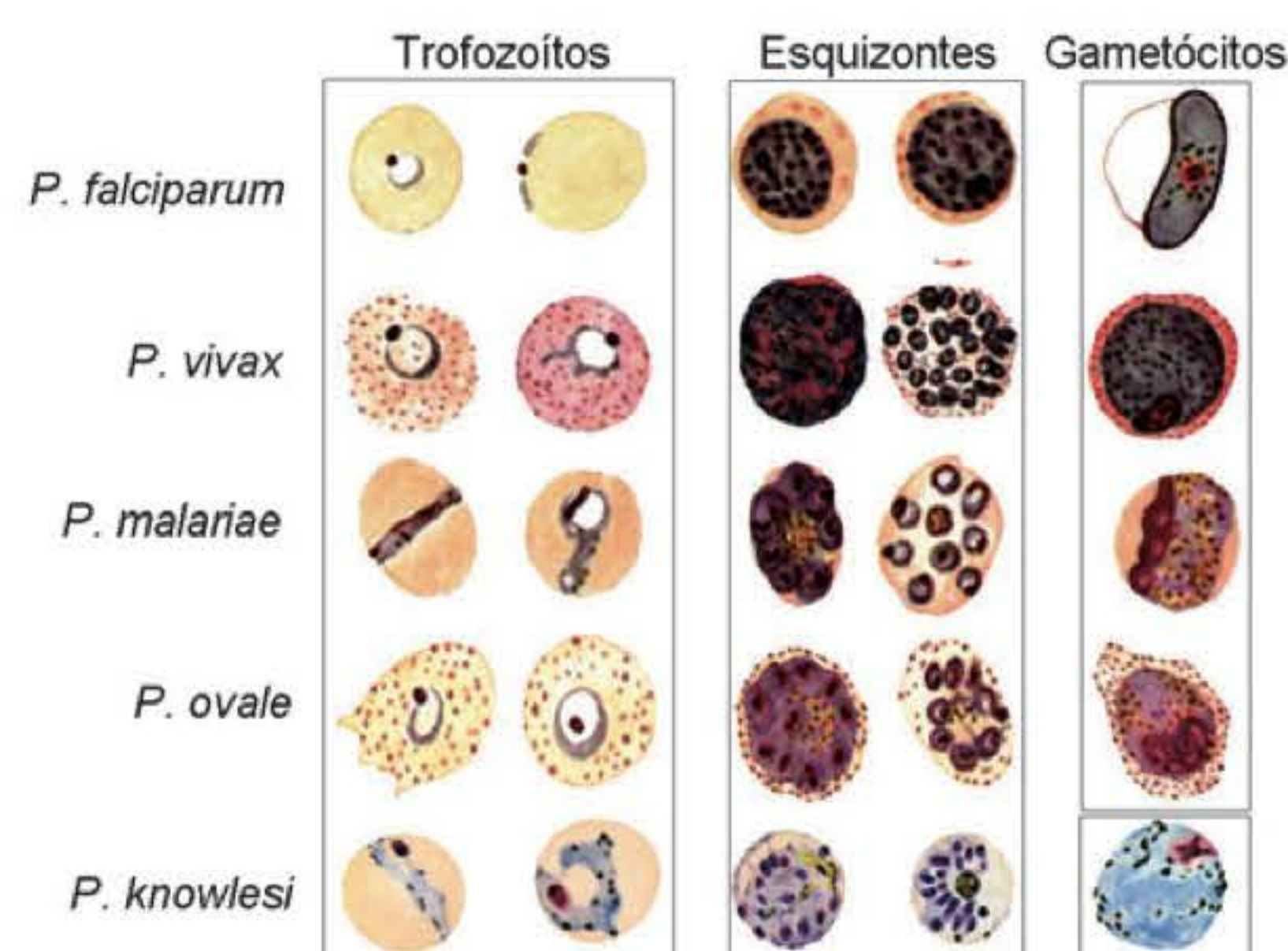
devem ser a pesquisa de plasmódios ou de seus componentes em hemácias (antígenos, DNA). Em estudos epidemiológicos, outros métodos podem ser úteis, pois os testes podem ser feitos em um laboratório central, com equipamentos especializados e passíveis de automação.

## ▪ Métodos para detecção de plasmódios nas hemácias

### Gota espessa

Quando Laveran, em 1880, descobriu os parasitos da malária em esfregaço de sangue de pacientes com febre, abriu caminho para que métodos de laboratório pudessem ser utilizados no diagnóstico da doença. Ronald Ross efetuou algumas mudanças no esfregaço sanguíneo, como o aumento na concentração de sangue e desmoglobinização, originando o método da gota espessa, que apresentou sensibilidade cerca de 20 vezes maior que o esfregaço comum.<sup>13</sup> A introdução de corantes biológicos com base no azul de metileno, que permitiram revelar a estrutura do parasito, e a melhora dos microscópios aperfeiçoaram a microscopia. A gota espessa permanece até os nossos dias como o método de escolha no diagnóstico da malária. Trata-se de um método satisfatório em termos de sensibilidade e especificidade, permite a identificação da espécie e estágio de desenvolvimento do plasmódio, fornece informações sobre a viabilidade do parasito e é quantificável.<sup>14</sup> A quantificação dos parasitos pode ser feita ou pela porcentagem de hemácias infectadas ou pelo número de parasitos/ $\mu\text{l}$  de sangue. A realização simultânea de um esfregaço sanguíneo corado pelo método Giemsa, no qual o sangue é fixado e os parasitos são visualizados dentro da célula, auxilia a identificação da espécie (Figura 24.4) e fornece informações generalizadas sobre parâmetros hematológicos.

A gota espessa apresenta desvantagens que devem ser consideradas. No método da gota espessa, o material não é fixado e, durante o processo de coloração, ocorre lise das hemácias, deixando os parasitos livres. A morfologia não é bem preservada e requer microscopistas bem treinados para se fazer uma avaliação crítica. Dowling e Shute demonstraram que, durante a coloração da gota espessa, pode ocorrer perda de 66% dos trofozoítos e de 80 a 90% dos gametócitos, o que se torna importante em parasitemias muito escassas, nas quais encontrar um parasito em três minutos é evento que ocorre puramente ao acaso, sendo às vezes necessários 30 min para se



**Figura 24.4** Diferentes estágios de plasmódios infectantes ao homem em esfregaço de sangue fixado com metanol e corado por Giemsa.



detectar um trofozoíto jovem de *P. falciparum* e 1 h 30 para se encontrarem gametócitos. Apesar dessa perda, quando o mesmo número de campos é examinado, a gota espessa é cerca de 20 vezes mais sensível que o método da extensão de sangue, devido à utilização de uma camada de sangue 20 a 30 vezes mais densa.<sup>15</sup> Portanto, a alta sensibilidade atribuída à gota espessa dificilmente é conseguida, pois, para tanto, o método se torna trabalhoso, demorado e requer microscopistas muito bem treinados e supervisão constante. A eficiência dos microscopistas frequentemente é menor do que se acredita, principalmente pela falta de treinamento (escolha adequada do pessoal, cursos de preparação, cursos de atualização) e manutenção adequada do equipamento (incluindo suprimento do material rotineiro, como óleo de imersão e corantes, inspeção periódica do microscópio). Em épocas de alta transmissão, um microscopista chega a examinar 100 lâminas em uma manhã, aumentando a probabilidade de baixas parasitemias não serem detectadas e ainda de a distinção da espécie não ser confiável. A ausência de condições ideais leva à ocorrência de falsos resultados, muito significantes no controle e tratamento da doença, principalmente em indivíduos não imunes.

Payne, avaliando o uso e as limitações da microscopia óptica comum, sugeriu condições ideais para o diagnóstico parasitológico da malária.<sup>16</sup> Quanto ao microscópio, a ampliação deve estar situada entre 500 e 1.000×, tendo como ideal entre 600 e 700× para o diagnóstico diferencial, devido à variação de tamanho do parasito de 1 µm para trofozoíto jovem de *P. falciparum* a 1 a 15 µm ou mais para *P. vivax* ou *P. ovale*. Com a concepção errada de que um aumento maior fornece melhores resultados, a maioria dos laboratórios utiliza oculares de 10× e objetiva de imersão de 100×, o que reduz a definição e produz aberração de cor. A detecção dos parasitos da malária é facilitada por corantes diferenciais que têm a propriedade de corar o material nuclear de vermelho e o material citoplasmático de azul. Essa diferenciação ocorre apenas em condições de pH ligeiramente básico, de 7,2. Entre os corantes utilizados, melhores resultados são obtidos pelo Giemsa, que é altamente estável em diferentes temperaturas.

O desenvolvimento do cultivo *in vitro* de *P. falciparum* e os estudos mais recentes do genoma do parasito, juntamente com a produção por manipulação genética de antígenos plasmodiais puros e a produção de anticorpos monoclonais específicos, permitem o desenvolvimento de reagentes usados em métodos diagnósticos, que têm sido estudados e propostos como alternativos à gota espessa.

### Quantitative buffy coat

O método do capilar – *quantitative buffy coat* (QBC®) – foi inicialmente desenvolvido para contagem de células sanguíneas e, posteriormente, adaptado e modificado para o diagnóstico de hemoparasitos.<sup>17</sup> O QBC® consiste em um capilar com resíduos de laranja de acridina e anticoagulante preenchido com cerca de 55 a 65 µl de sangue. Um cilindro plástico com densidade específica de 1,059, média entre a do plasma (1,028) e a de hemácias (1,090), é inserido no capilar e, após centrifugação, fica posicionado na parte superior das hemácias e recoberto pela camada de leucócitos. O cilindro provoca expansão física do sangue e força os componentes celulares dentro de um espaço de 40 µm, que podem ser observados em microscópio de fluorescência. Hemácias parasitadas por plasmódios são menos densas que as não parasitadas e a densidade diminui com o estágio de amadurecimento do parasito. Com essa alteração na densidade, após a centrifugação, as hemácias parasitadas ficam na interface entre as camadas

de leucócitos e de hemácias, ao redor do cilindro plástico. Em função do maior volume utilizado (cerca de 100× maior do que o utilizado na gota espessa) e da concentração das hemácias parasitadas em uma região limitada, o método torna-se muito sensível.

A sensibilidade do QBC® para a detecção de plasmódios no sangue é cerca de oito vezes maior do que a da gota espessa.<sup>18,19</sup> Além da maior sensibilidade, o método ainda apresenta outras vantagens em relação à gota espessa:

- Maior reprodutibilidade – Pela simplicidade de execução; não há variabilidade dependente de técnicos e do processo de coloração
- Facilidade de leitura – A fluorescência do parasito é inequívoca e não há *debris* que possam levar a falsos resultados positivos
- Rapidez de execução – Visto que, entre a coleta de sangue, preparação do capilar, centrifugação e leitura são gastos, no máximo, 10 min, mesmo em baixas parasitemias. Apresenta a desvantagem de necessitar de centrífuga especial, de microscópio de fluorescência com objetiva especial e de tubos capilares com bastões inseridos.

### Métodos para detecção de DNA ou RNA de plasmódio no sangue

Ensaio com base em amplificação do ácido nucleico têm sido desenvolvidos e avaliados no diagnóstico da malária, sendo que, em geral, apresentam melhores sensibilidade e especificidade, quando comparados à gota espessa e aos métodos sorológicos.<sup>20</sup> Também permitem melhor discriminação da espécie de *Plasmodium*, principalmente nos casos de infecções mistas, que muitas vezes não são diagnósticas pela gota espessa, fundamental para o estabelecimento da terapia adequada. A correta discriminação das espécies de *Plasmodium* é necessária para se entender a influência de infecções mistas na “doença malária” e garantir que a implantação de futuras vacinas e fármacos antimaláricos seja conduzida de maneira segura e oportuna.<sup>21</sup> A complexidade da técnica ainda dificulta a sua aplicação em setores primários de saúde para o diagnóstico precoce, mas a sua utilização tem sido indicada para a detecção de assintomáticos em áreas de diferentes endemicidades ou em estudos epidemiológicos, monitoramento da resposta de pacientes a substâncias antimaláricas, caracterização genotípica dos plasmódios, triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas e como teste de referência para avaliação do desempenho de novos testes diagnósticos.<sup>22</sup>

Atualmente, é possível a amplificação de genes das cinco espécies de parasitos da malária humana, sendo que as principais sequências de DNA que têm sido amplificadas são os genes que codificam antígenos de superfície (p. ex., proteína da superfície da hemácia infectada com formas jovens de *P. falciparum* – Pf155/RESA, proteína circunsporozoíta [CSP]), o gene da di-hidrofolato redutase-timidilato sintetase, o gene da proteína 126 de *P. falciparum* (Pf126), o gene que codifica CoxI mitocondrial e principalmente o gene da subunidade 18S de rRNA.

### PCR com base na amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA

O ribossomo é constituído de partículas ribonucleoproteicas responsáveis pela tradução do código genético e contém 50 a 60% de RNA em sua estrutura. Nos eucariotos, os ribossomos contêm três moléculas principais de RNA (rRNA),



chamadas de 5S, 17 ou 18S (subunidade menor), 26 ou 28S rRNA (subunidade maior) e, em alguns, também está presente a subunidade 5,8S.<sup>23</sup> O rRNA é a macromolécula celular mais abundante do plasmódio, representando de 0,2 a 1,0 pg do parasito, muito mais do que o DNA total, que representa 0,02 pg.<sup>24</sup> Os rRNA, na maioria dos eucariotos, apresentam estruturas e funções quase equivalentes e os genes que codificam essas moléculas também apresentam similaridade na estrutura organizacional e no controle transcricional. Todavia, os genes do rRNA de *Plasmodium* são distintos estruturalmente e são expressos em diferentes estágios de desenvolvimento do parasito.<sup>25</sup> Algumas características da organização gênica do rRNA de *Plasmodium* diferem da maioria dos genes do rRNA dos eucariotos. Como exemplo, na maioria dos eucariotos os genes ribossômicos são altamente repetitivos, organizados em arranjos em *tandem* e estão localizados em uma ou em poucas regiões no genoma, enquanto as espécies de *Plasmodium* apresentam de quatro a oito genes, dispersos em vários cromossomos.

A subunidade 18S rRNA e seus genes correspondentes têm sido o alvo para estudos de transcrição e processamento do rRNA de *Plasmodium*, e uma das características mais interessantes é que sua expressão é claramente regulada durante o ciclo de vida do parasito. O gene do tipo A é expresso nas formas do estágio eritrocítico assexuado do parasito, o gene

do tipo S é expresso na fase de esporozoíto e o gene do tipo O está associado ao desenvolvimento do oocisto no mosquito infectado. Também tem sido muito usada como alvo molecular ideal para a identificação da espécie *Plasmodium*, pois representa 30% do RNA total e 70% de sua sequência é diferente da sequência correspondente no homem.<sup>26</sup> É constituída de um mosaico de regiões conservadas e variáveis, um tipo de arranjo que permite a amplificação de sequências a partir de amostras utilizando *primers* que são conservados dentro do gênero *Plasmodium*.<sup>27</sup>

Snounou *et al.* desenvolveram a primeira reação em cadeia da polimerase (PCR) com base na amplificação do gene da 18S rRNA para quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (PCR-Snounou) que foi capaz de detectar 10,2% a mais de infecções do que a gota espessa em 196 amostras de sangue de pacientes.<sup>28</sup> A partir desta, diferentes variáveis têm sido estudadas, como:

- **Nested-PCR (nPCR):** a nPCR constitui-se de duas reações de PCR consecutivas, em que o produto da primeira serve como alvo para a segunda reação (p. ex., primeiro ciclo usando *primers* da região-alvo 18S rRNA gênero-específicos (*Plasmodium* sp.)). Os *primers* da segunda reação são oligonucleotídeos complementares às sequências internas do produto obtido na primeira reação (no caso, *primers* espécie-específicos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*).<sup>29</sup>

**Quadro 24.2 ▪ Resultados de estudos de campo de diferentes variáveis da PCR com base na amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA .**

Ensaio	Estudo	População (N)	Resultados	
			Outros métodos	PCR em análise
PCR-Snounou	Tailândia <sup>28</sup>	196	GE: 106 pos (76,4% Pf, 21,7% Pv, 1% Pm, 1% Pf/Pv)	126 pos (70,6% Pf, 9,5% Pv, 1,6% Pm, 0,8% Po, 19,0% Pf/Pv, 0,8% Pf/Pm)
nPCR	Tailândia <sup>29</sup>	25	sn-PCR: 15 pos (11 Pf, 2 Pv, 1 Pm, 1 Pf/Pm)	17 pos (8 Pf, 1 Pv, 5 Pf/Pv, 1 Pf/Pm, 1 Pf/Pv/Po, 1 Pf/Pv/Po/Pm)
	Malásia <sup>34</sup>	166	GE: 24,1% Pf, 13,3% Pv, 3,6% Pf/Pv	25,9% Pf, 13,3% Pv, 4,8% Pf/Pv
	Venezuela <sup>35</sup>	100	GE: 10% Pf, 59% Pv	12 % Pf, 46 % Pv, 29% Pf/Pv
	Nigéria <sup>36</sup>	590	GE: 48,6% pos	68,3% pos (323 Pf, 1 Pm, 1 Po, 41 Pf/Pm, 12 Pf/Po, 27 Pf/Pm/Po)
	Papua-Nova Guiné <sup>37</sup>	173	GE: 87 pos (32%)	163 pos (8,5% Pf, 8,7% Pv, 1,7% Pm, 23,1% Pf/Pv, 9,3% Pf/Pm, 2,3% Pf/Po, 1,7% Pv/Pm, 15,6% Pf/Pv/Pm, 4,6% Pf/Pv/Po, 2,9% Pf/Pm/Po, 0,6% Pv/Pm/Po, 5,2% Pf/Pv/Pm/Po)
	Irã <sup>38</sup>	120	GE: 107 pos (70% Pv, 16,7% Pf, 2,5% Pf/Pv)	116 pos (58,3% Pv, 10% Pf, 28,4% Pf/Pv)
PCR-ELISA	Quênia <sup>31</sup>	100	GE	S = 98,6%, E = 96%, VPP = 98,6%, VPN = 96%
	Tóquio, Japão <sup>32</sup>	106	GE: 76 amostras pos pela microscopia (36 Pf, 27 Pv, 11 Po e 2 Pm)	S, E = 100% para Pf, Po e Pm; S = 96% e E = 100% para Pv
	Tailândia <sup>39</sup>	151	GE	S = 91,4% para Pf, 94,2% para Pv e E = 95,8%
sn-PCR	Vietnã e China <sup>30</sup>	35	PCR-ELISA-K	Boa concordância, mas melhor sensibilidade para detectar infecções mistas em baixas parasitemias
	Tailândia/Mianmar <sup>40</sup>	437	GE: 35,9% Pf, 20,6% Pv, 41,6% Pf/Pv, 1,8% negativo	33,4% Pf, 18,7% Pv, 0,2% Pm, 36,6% Pf/Pv, 1,1% Pf/Pm, 1,1% Pv/Pm, 6,4% Pf/Pv/Pm, 1,1% Pf/Pv/Po, 0,9% Pf/Pv/Pm/Po, 0,2% negativo
	Rondônia, Brasil <sup>41</sup>	96	GE: 45% Pf, 55% Pv	38,5% Pf, 31,2% Pv, 1% Pm, 21% Pf/Pv, 2,1% Pf/Pm, 5,2% Pv/Pm, 1% Pf/Pv/Pm
	Sudeste de Laos <sup>42</sup>	336	15,2% Pf, 1,2% Pv, 0,3% Po, 0,6% Pf/Pv	21,7% Pf, 3,6% Pv, 0,6% Pm, 0,9% Po, 5,7% Pf/Pv, 0,6% Pf/Pm, 0,6% Pv/Pm, 0,3% Pv/Po, 0,3% Pf/Pv/Pm, 0,3% Pf/Pv/Po, 0,3% Pf/Pv/Pm/Po
	Mato Grosso, Brasil <sup>43</sup>	213 (área endêmica) e 50 (banco de sangue de área não endêmica)	Infecção por plasmódio positiva na GE e/ou QBC	S, VPN = 100% E, VPP = 100% Diagnosticou 39% (Pf) 43,0% (Pv) e 88,9% (Pm) a mais que a GE

Pf = *P. falciparum*; Pv = *P. vivax*; Pm = *P. malariae*; Po = *P. ovale*; GE = gota espessa; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; pos = amostras com resultados positivos.



- **Semi-nested-PCR (snPCR):** a snPCR é uma variação da nPCR que difere apenas pelo fato de que, na segunda reação, os *primers* usados consistem em um dos *primers* da primeira reação em combinação com um novo *primer*.<sup>30</sup>
- **PCR-ELISA:** é uma PCR seguida de um ensaio imunoenzimático (PCR-ELISA), em que a região 18S rRNA é amplificada utilizando *primers* gênero-específicos, um deles marcado com biotina, e o produto amplificado é hibridizado com sondas derivadas de sequências espécie-específicas do rRNA marcadas com digoxigenina. O material hibridizado é transferido para microplacas sensibilizadas com estreptavidina, após período de incubação é adicionado o conjugado antidigoxigenina-peroxidase e, após um novo período de incubação, é adicionado o substrato e a cor desenvolvida é detectada por colorimetria.<sup>31</sup> Kimura *et al.* desenvolveram outra PCR-ELISA (PCR-ELISA-K) em que o alvo 18S rRNA é amplificado pela PCR e o produto amplificado é transferido para microplacas sensibilizadas com sondas específicas para cada espécie de parasito e a detecção é feita por ensaio colorimétrico.<sup>32</sup>
- **PCR multiplex (mPCR):** a mPCR é uma reação de PCR clássica que utiliza, ao mesmo tempo, mais de um par de *primers*, ocorrendo portanto a coamplificação de dois ou mais alvos diferentes.<sup>33</sup>

No Quadro 24.2 são apresentados os resultados de diferentes avaliações de PCR com base na amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA.

### PCR em tempo real quantitativo

A PCR em tempo real quantitativo (PCR-TRQ) é uma técnica que usa corantes que se ligam ao DNA, como SYBR®

Green, ou sondas moleculares marcadas com corantes fluorescentes. Os amplicons podem ser quantificados pelo sinal emitido após cada ciclo de PCR e os resultados quantificáveis podem ser gerados em menos de 3 h para múltiplas amostras simultaneamente. Além de permitir quantificação, este método tem a vantagem de que nenhum manuseio da amostra precisa ser feito, uma vez que esta é adicionada à mistura da reação, reduzindo assim a possibilidade de contaminação.

Diversos PCR-TRQ têm sido desenvolvidos e avaliados no diagnóstico da malária e, em geral, mostram ótimo desempenho em sensibilidade e especificidade, além da vantagem de permitir a quantificação do DNA de *P. falciparum*. No Quadro 24.3 estão resumidos os resultados de avaliações em campo de algumas variáveis de PCR-TRQ.

Numerosos métodos de PCR foram desenvolvidos, porém, existe muita variabilidade na implementação desses ensaios entre os laboratórios com consequente variação nos parâmetros de sensibilidade e especificidade. Resultados diferentes para a mesma amostra de pacientes podem resultar da variabilidade intrínseca na sensibilidade do ensaio ou da calibração usando diferentes reagentes, que não tenham sido devidamente padronizados. Atenta a essa situação, a OMS desenvolve padrões internacionais a serem usados em ensaios com base em tecnologia de ácido nucleico para o diagnóstico de diferentes infecções, principalmente virais, como as hepatites, e recentemente estabeleceu um padrão internacional também para o diagnóstico de DNA de *P. falciparum* (estocado no Instituto Nacional para Padrões Biológicos e Controles – NIBSC *code number* 04/176).<sup>22</sup> O uso desses padrões internacionais asseguraria a implementação consistente dos ensaios

**Quadro 24.3 - Resultados de estudos de campo de diferentes variáveis da PCR em tempo real quantitativo com base na amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA de *Plasmodium*.**

Ensaio de PCR-TRQ	Estudo	Espécies de <i>Plasmodium</i> detectadas	População (N)	Resultados   Nº de amostras positivas	
				Outros métodos	PCR-TRQ
Sonda TaqMan	Quênia <sup>45</sup>	<i>Pf</i>	2139	GE: 265/2.139 TR: 237/941, 72/283 Nested-PCR: 1.070/1.939	738/2.009
Sondas de hibridização FRET	Tailândia <sup>46</sup>	Gênero e <i>Pf, Pv, Pm, Po</i>	297	GE: 292	284
SYBR® Green	EUA, Malásia, Myanmar, Tailândia <sup>47</sup>	<i>Pf, Pv, Pm, Po</i>	358	GE: 76	74
Real-time QT-NASBA	Quênia, Tanzânia <sup>48</sup>	Gênero	338	GE: 63 TR: 64/338, 62/338, 69/184 Nested-PCR: 94	91
SYBR® Green	Tailândia Ocidental <sup>49</sup>	<i>Pf, Pv, Pm, Po</i>	136	GE: 89 PCR convencional: 91 Nested-PCR: 91	91
Sonda TaqMan	Brasil <sup>50</sup>	<i>Pf, Pv, Pm, Po</i>	64	GE: 33 TR: 20/28 PCR convencional: 33	33
Sonda TaqMan	Guiana Francesa <sup>51</sup>	<i>Pf, Pv, Pm</i>	263	GE: 188 Nested-PCR: 189	189
Sonda TaqMan	Malásia <sup>52</sup>	<i>P. knowlesi</i>	40 <i>P. knowlesi</i> 67 outras espécies de <i>Plasmodium</i> (31 <i>Pf</i> , 23 <i>Pv</i> , 6 <i>Po</i> , 3 <i>Pm</i> , 1 <i>Pm/Po</i> , 1 <i>Pf/Pm</i> , 1 <i>Pi</i> , 1 <i>Pc</i> )	Nested-PCR: 40	40 e negativo em todas as amostras de outras espécies

*Pf* = *P. falciparum*, *Pv* = *P. vivax*, *Pm* = *P. malariae*, *Po* = *P. ovale*. GE = gota espessa; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; TR = teste rápido imunocromatográfico. Adaptado de Bourgeois *et al.*<sup>44</sup>



nos diferentes laboratórios, permitiria comparação entre laboratórios, providenciaria materiais para validação dos ensaios e, principalmente, disponibilizaria padrões secundários para monitorar os ensaios.

### ▪ Métodos para detecção de componentes antigênicos plasmodiais

A pesquisa de antígenos plasmodiais no soro de pacientes com malária foi descrita inicialmente por McGregor *et al.*,<sup>53</sup> utilizando dupla difusão em gel de ágar. A partir de então, diferentes técnicas para detecção de componentes antigênicos plasmodiais foram padronizadas e avaliadas, como variações de radioimunoensaio (RIE) e enzaimunoensaio (EIE) (métodos de competição, competição com anticorpos anti-idiótipos, duplo-anticorpo com anticorpos monoclonais, duplo-anticorpo com anticorpos monoclonais e policlonais, DOT-EIE e outros) e o teste rápido imunocromatográfico (TR). Em geral, esses métodos apresentam bons limiares de detecção *in vitro*, mas, quando aplicados em amostras de pacientes, os resultados são inferiores ou comparáveis aos da gota espessa. Ainda, o RIE apresenta desvantagens adicionais como o uso de material radioativo, alto custo e vida média curta dos isótopos radioativos.

Possíveis razões para a baixa sensibilidade e também para a não correlação entre o grau de parasitemia e os resultados obtidos nos testes para pesquisa de componentes antigênicos são:

- Quando a infecção progride, anticorpos produzidos contra antígenos plasmodiais formam imunocomplexos resultando no clareamento dos antígenos da circulação sanguínea
- Diversidade antigênica dos estágios eritrocíticos dos plasmódios
- Capacidade de ligação dos anticorpos monoclonais utilizados para captura dos antígenos, pois variações qualitativas ou quantitativas dos epitopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais em diferentes isolados podem afetar a ligação
- Variação no estágio de desenvolvimento dos parasitos encontrados nas amostras de sangue, principalmente para malária *vivax*, que levam a conteúdos de proteínas diferentes qualitativa e quantitativamente.

Alguns fatores do antígeno-alvo devem ser considerados para o desenvolvimento desses testes, como:

- Não persistência na circulação na ausência do parasito
- Ser abundante
- Não apresentar grande diversidade genética
- Ser estruturalmente diferente de antígenos não plasmodiais possivelmente encontrados no sangue
- Ser comum a todas as espécies de plasmódios humanos (pan-específico), dependendo do objetivo do teste.

O desenvolvimento de *testes imunocromatográficos ou rápidos* (TR) representou um avanço no diagnóstico da malária, principalmente em regiões onde é difícil manter um diagnóstico microscópico de qualidade. Os TR foram idealizados com base na detecção de antígenos derivados de parasitos da malária, liberados após lise das hemácias, por anticorpos monoclonais e/ou policlonais. Os primeiros TR foram desenvolvidos com a finalidade de diagnosticar infecções por *P. falciparum* em sangue total, por meio da detecção de uma proteína específica desta espécie, a proteína rica em histidina 2 (PfHRP2). Posteriormente, surgiram outras apresentações, com base na detecção de enzimas do parasito, como vários subtipos da lactato desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH) e a aldolase.

A PfHRP2 é uma proteína hidrossolúvel composta por uma série de sequências repetitivas de aminoácidos, produzida por estágios assexuados e gametócitos jovens, sendo observada em isolados de *P. falciparum* de diferentes continentes. Todas as cepas adaptadas em cultura expressam essa proteína, sendo detectada *in vitro* no sobrenadante de cultura de parasitos sincronizados de duas a oito horas depois do desenvolvimento de anéis, e ativamente secretada no sangue, como um antígeno solúvel em água, mesmo durante o sequestro das hemácias infectadas na vasculatura. Durante o ciclo eritrocítico, a quantidade de PfHRP2 liberada *in vitro* continua aumentando, com uma grande quantidade sendo liberada no momento da ruptura dos esquizontes. A enzima glicolítica lactato desidrogenase (pLDH) é produzida pelas formas assexuadas e sexuais de *Plasmodium* e pode ser detectada por anticorpos que se ligam a epitopos comuns a todas as espécies (pLDH-pan) ou específicos para a pLDH de uma espécie em particular (*P. falciparum* [pLDH-Pf], *P. vivax* [pLDH-Pv]), específica para todas as espécies excluindo *P. falciparum*, ou seja *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (pLDH-Pvom). Como é produzida apenas por parasitos vivos, os níveis de pLDH acompanham a parasitemia periférica, sendo portanto, um bom marcador para seguimento de infecção ativa. A aldolase é uma enzima encontrada na via glicolítica de todas as espécies de *Plasmodium*. No Quadro 24.4 são apresentadas as espécies que podem ser detectadas dependendo dos antígenos-alvo do TR.<sup>54</sup>

Os testes rápidos para malária podem ser encontrados em quatro formatos diferentes: cassete, *dipstick*, cartão ou híbrido, que combina diferentes elementos (apresentados na Figura 2.18, Capítulo 2).

Em geral, esses testes empregam um suporte de nitrocelulose sensibilizado com anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados contra antígenos parasitários, como a PfHRP2, pLDH e aldolase de *Plasmodium*. Os testes rápidos são de simples execução, fácil interpretação, revelam os resultados em aproximadamente 15 min e podem ser armazenados em temperatura ambiente. De modo geral, o procedimento envolve os seguintes passos: o sangue é coletado após punção digital, em

**Quadro 24.4 ▪ Antígenos-alvo dos testes rápidos para o diagnóstico da malária.**

Espécies de plasmódios	HRP2	pLDH				Aldolase
		pLDH-Pf	pLDH-Pan	pLDH-Pvom	pLDH-Pv	
<i>P. falciparum</i>	X	X	X			X
<i>P. vivax</i>			X	X	X	X
<i>P. malariae</i>			X	X		X
<i>P. ovale</i>			X	X		X

HRP2 = proteína rica em histidina 2; pLDH = lactato desidrogenase de *Plasmodium*; Pf = *P. falciparum*; Povom = *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*; Pv = *P. vivax*; Pan = todas as espécies de *Plasmodium*. Adaptado de WHO, 2011.<sup>54</sup>



tubo microcapilar contendo ou não anticoagulante; a amostra é misturada a um tampão de lise e a um anticorpo específico, marcado com ouro coloidal ou rodamina, formando um complexo antígeno-anticorpo marcado, nos casos positivos. Alguns testes apresentam o anticorpo marcado depositado na fita de nitrocelulose, e somente a solução de lise é adicionada ao sangue. O complexo migra por capilaridade, de encontro à linha ou às linhas de captura do antígeno por um anticorpo específico e a uma linha controle, na qual outro anticorpo captura o anticorpo marcado.

Esses testes apresentam algumas vantagens em relação à gota espessa, pois dispensam o uso de microscópios, não exigem pessoal qualificado e podem ser utilizados em áreas remotas, sem infraestrutura laboratorial e sem eletricidade. Como esses testes detectam antígenos circulantes, podem ser úteis no diagnóstico de malária por *P. falciparum*, quando os parasitos estão aprisionados em capilares profundos ou em placenta e a gota espessa resulta negativa. Porém, apresentam algumas desvantagens: não são quantitativos, são pouco sensíveis em baixas parasitemias, são incapazes de diferenciar entre formas assexuadas e sexuadas, podem resultar positivos mesmo após o clareamento parasitário devido aos antígenos circulantes que podem persistir na corrente circulatória, além de apresentarem custo maior que o da gota espessa.

O ParaSight®-F foi o primeiro teste imunocromatográfico descrito,<sup>55</sup> sendo utilizados dois anticorpos, um monoclonal e um policlonal marcado com rodamina, para revelar a ocorrência da PfHRP2 no sangue de portadores de malária por *P. falciparum*. Diversos estudos foram realizados com este teste.<sup>56-57</sup>

O ICT Malaria Pf também pesquisa PfHRP2, porém difere no reagente utilizado para marcar o anticorpo anti-PfHRP2, neste caso o ouro coloidal, e na apresentação em cartão, bastante apropriada para uso em campo. Porém, o desempenho do ICT Malaria Pf mostrou-se inferior ao do ParaSight®-F.<sup>58</sup> O ICT Malaria Pf/Pv detecta a PfHRP2 e um antígeno gênero-específico pan-malárico, presente nas quatro espécies de *Plasmodium* de humanos. Porém, não é capaz de diferenciar entre infecções causadas por *P. vivax*/*P. malariae*/*P. ovale*.<sup>59</sup>

Em estudo utilizando isolados de cultura de *P. falciparum*, o Malar-Check® Pf foi capaz de detectar 80 parasitos/mm<sup>3</sup>, enquanto a gota espessa detectou 10 parasitos/mm<sup>3</sup>. Com isolados de campo, este teste apresentou sensibilidade de 97,4% e especificidade de 88,5%. O teste, com base na detecção de PfHRP2, não mostrou reações cruzadas com soros positivos para fator reumatoide.<sup>60</sup>

O OptiMAL Rapid Malaria Test detecta isoformas da pLDH. Uma isoforma é específica para *P. falciparum* e a outra ocorre nas quatro espécies de plasmódios humanos.<sup>61</sup> Entretanto, diversos autores relataram baixa sensibilidade.<sup>62</sup> Além deste aspecto, o teste não permite distinguir *P. vivax*/*P. malariae*/*P. ovale* em infecção associada a *P. falciparum*, devido à reação cruzada com a banda pan-específica.

Embora sejam adequados para o diagnóstico em áreas remotas por sua simples exequibilidade, todos esses testes mostram grande variação em sua sensibilidade e especificidade, como foi demonstrado por vários autores, de diferentes regiões.<sup>59,62,63</sup> Os resultados com os testes que detectam especificamente *P. falciparum* mostram sensibilidade maior que 90%, geralmente em amostras de sangue com parasitemias acima de 100 parasitos/mm<sup>3</sup>, decaindo para 80 a 90% em densidades parasitárias abaixo disso.<sup>64</sup> Além disso, resultados falso-positivos podem ocorrer devido a antígenos circulantes que são detectados mesmo após a cura parasitológica e ao fator reumatoide no plasma. Outra desvantagem é a possibilidade

de resultados falso-negativos em altas parasitemias, devido ao excesso de antígeno.

Alguns autores afirmam que os testes para detecção de malária não *falciparum* por meio da pLDH podem ser tão sensíveis para o diagnóstico de *P. vivax* como de *P. falciparum*,<sup>61,65</sup> contrariamente aos testes que detectam o antígeno pan-malárico, que exibem baixa sensibilidade no diagnóstico de *P. vivax*.<sup>59</sup>

Nos testes que detectam pLDH não têm sido observados resultados falso-positivos devido à permanência de antígenos circulantes,<sup>61</sup> os quais poderiam ser usados para acompanhar o clareamento parasitário pós-tratamento. Porém, um estudo utilizando OptiMAL Rapid Malaria Test para avaliação da eficácia do quinino, em pacientes semi-imunes, mostrou positividade do OptiMAL Rapid Malaria Test, quando a gota espessa apresentava apenas gametócitos de *P. falciparum*. O acompanhamento dos pacientes mostrou que não houve retorno da parasitemia assexuada e, portanto, os autores sugeriram ser o gametócito um potente produtor de pLDH, exigindo cuidado na avaliação dos resultados pós-terapêutica.<sup>66</sup>

Os testes rápidos têm ação adjuvante no diagnóstico da malária no monitoramento de resposta à terapêutica antimalárica utilizada, no diagnóstico em viajantes febris após retorno de regiões endêmicas, na triagem de doadores de sangue e na detecção de malária com transmissão congênita.

A opção pelo uso das diferentes apresentações dos testes rápidos varia em função das situações específicas exigidas no diagnóstico da malária. No monitoramento de respostas à terapia antimalárica, os testes que detectam as isoformas pLDH mostram-se mais adequados, pois esta enzima só está ativa em parasitos viáveis. No entanto, é preciso considerar que a produção pode estar relacionada com a existência de formas sexuais, que não respondem pela manifestação clínica da doença, mas são importantes na transmissão. Para estabelecer essa diferenciação, é aconselhável, sempre que possível, a realização concomitante da gota espessa. Os testes que combinam a detecção de PfHRP2 e aldolase são mais apropriados para o diagnóstico de viajantes que apresentem febre após retorno de áreas endêmicas de malária, visto que possibilitam a detecção de *P. falciparum* além das outras espécies, em um mesmo teste.

Estudos mostram que os testes imunocromatográficos podem revelar uma reação falso-positiva em pacientes com fator reumatoide,<sup>67</sup> o qual se caracteriza por autoanticorpos dirigidos contra determinantes antigênicos de moléculas de IgG e geralmente está associado à artrite reumatoide. Também é encontrado em infecções virais, parasitárias, bacterianas e em algumas doenças tropicais, nas quais há estimulação antigênica crônica. Um estudo realizado para avaliar o desempenho dos testes ICT Malaria Pf (PfHRP2) e OptiMal It (pLDH) em pacientes que apresentaram febre após retornarem de área endêmica revelou reação cruzada com fator reumatoide. A reação cruzada com soro positivo para fator reumatoide ocorreu em 6,6% com o teste ICT Malaria Pf e em 3,3% com o OptiMal It. A reação cruzada ocorreu devido à produção, pelos pacientes com doenças reumáticas, de autoanticorpos IgG, que, ao se ligarem inespecificamente com os anticorpos fixados na fita de nitrocelulose, revelaram resultado falso-positivo nos testes com base tanto na detecção da proteína PfHRP2 como da enzima pLDH.<sup>68</sup>

Até o momento não há disponível um tipo de teste imunocromatográfico capaz de diferenciar entre *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Se, por um lado, a impossibilidade de distinção entre estes três agentes etiológicos da malária benigna não acarreta importantes consequências para a escolha da terapêutica específica, por outro lado compromete a avaliação epidemiológica da distribuição das espécies em cada região.



Outro desafio relacionado com os testes rápidos é torná-los mais acessíveis economicamente, visto que o custo da microscopia é de US\$ 0,20 a US\$ 0,40 por unidade de diagnóstico, enquanto o preço dos testes rápidos varia de US\$ 0,60 a US\$ 1.

A PfHRP2 apresenta maior estabilidade que a pLDH, como comprovado em vários estudos. Por outro lado, a pLDH tem a propriedade de detectar diferentes espécies de *Plasmodium*, sendo mais útil onde não há predominância de *P. falciparum*. A acurácia do diagnóstico com base nos testes rápidos depende da qualidade do produto, das condições de armazenamento e transporte, bem como da capacidade do profissional para realizar e interpretar a reação. Altas temperaturas, comuns em áreas endêmicas para malária, influenciam muito o desempenho dos testes rápidos, acarretando diminuição da sensibilidade. Recentemente foram relatadas falhas no diagnóstico de malária por *P. falciparum* no Peru e no Brasil com teste rápido para detecção de PfHRP2 causadas por deleção dos genes pfHRP2 e pfHRP3, encontrada em 41 e 70% nas amostras analisadas, respectivamente.<sup>69</sup>

Considerando as características inerentes aos diversos testes rápidos, os antígenos-alvo e suas propriedades, vantagens e desvantagens, seu uso deve ser fundamentado em rígidos critérios e em situações específicas, para que não haja comprometimento do diagnóstico da malária.

O número de TR disponíveis no mercado tem crescido rapidamente desde a sua introdução no final da década de 1990. Estima-se que cerca de 60 fabricantes produzam mais 200 tipos de TR e que tenham sido comercializados entre 50 e 70 milhões de testes em 2008 e 90 milhões em 2009. Como a qualidade dos produtos varia muito, as agências responsáveis pela aquisição enfrentam problemas na escolha de TR de qualidade assegurada e com desempenho diagnóstico elevado.<sup>70</sup>

Deste modo, em 2006, a OMS em colaboração com o Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) e a Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) lançaram um programa para avaliação dos TR disponíveis no mercado. Inicialmente, foram testados 68 produtos, dos quais 22 para *P. falciparum*, 39 distinguindo *P. falciparum* e não *P. falciparum*, seis para *P. falciparum* e não *P. falciparum* sem distinção entre eles, e um para *P. vivax*. Vários TR detectam parasitemias baixas (200 parasitos/ $\mu$ l), apresentam alta especificidade, são estáveis a temperaturas tropicais, são de fácil execução e detectam *P. falciparum*, *P. vivax* ou ambos. Para *P. falciparum*, a maior taxa de detecção foi obtida com o antígeno HRP2, mas alguns testes para pLDH também foram eficientes. No total, 26 produtos alcançaram os critérios da OMS para licitação e estão listados no WHO WebBuy. Esses resultados foram publicados, formando uma base para os critérios de aquisição da OMS e das agências governamentais. Com base nesses resultados, a OMS recomenda os testes que tiveram bom desempenho para os locais onde não se dispõe de microscopia eficiente.<sup>70</sup>

## ▪ Métodos para detecção de anticorpos

Na infecção por plasmódios, o hospedeiro vertebrado produz anticorpos de diferentes especificidades. A maioria desses anticorpos não é dirigida contra componentes antigênicos dos plasmódios, mas são anticorpos heterófilos ou autoanticorpos contra hemácias, linfócitos, complemento, ou fator reumatoide e fatores antinucleares. Essa reatividade não específica ocorre provavelmente pela ação mitogênica de antígenos solúveis de plasmódios que leva à ativação policlonal de linfócitos B.

Os anticorpos específicos podem ser dirigidos contra antígenos dos diferentes estágios do plasmódio:

- Anticorpos contra antígenos do estágio eritrocítico assexuado
- Anticorpos contra antígenos do estágio de esporozoíto
- Anticorpos contra antígenos do estágio sexuado (gametócitos).

### Anticorpos contra antígenos do estágio eritrocítico assexuado

Os anticorpos são mediadores importantes da imunidade adquirida à malária, como evidenciado em modelos experimentais e estudos de transmissão passiva, em que os anticorpos de indivíduos imunes foram usados no tratamento de pacientes com malária grave.<sup>71</sup> Após várias exposições ao *Plasmodium*, os indivíduos desenvolvem imunidade efetiva que controla a parasitemia e reduz os sintomas e as complicações.

Anticorpos contra antígenos do merozoíto são considerados importantes na proteção por meio da inibição da invasão das hemácias, opsonização dos merozoítos para fagocitose e inibição celular dependente de anticorpos.<sup>71</sup>

As proteínas de superfície dos merozoítos (MSP) parecem estar envolvidas na ligação inicial deste à superfície da hemácia (p. ex., MSP1), e o antígeno 1 da membrana apical (AMA1) tem sido implicado na reorientação apical do merozoíto antes da invasão. As proteínas de ligação às hemácias, presentes nas organelas apicais (p. ex., EBA175, EBA181, EBA140) também são necessárias para a invasão. Há numerosas proteínas de superfície cuja função não é conhecida, como MSP2, MSP3, MSP4 e proteína rica em glutamato (GLURP).

A MSP1 está presente em todas as espécies de *Plasmodium*.<sup>72</sup> Apresenta de 180 a 230 kDa, sendo a precursora de várias proteínas importantes da superfície dos merozoítos. Os anticorpos que reconhecem a MSP1 normalmente estão presentes nas infecções por *Plasmodium*. Estudos feitos em *P. falciparum* mostraram que a MSP1 (PfMSP1) é uma glicoproteína com aproximadamente 200 kDa, sintetizada durante a esquizogonia como uma proteína única presa à membrana plasmática do parasito por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Durante o desenvolvimento do merozoíto, essa proteína precursora é clivada por proteases em quatro fragmentos principais – MSP1<sub>83</sub>, MSP1<sub>28</sub>, MSP1<sub>38</sub> e MSP1<sub>42</sub> – que ficam presos na superfície do parasito pelo fragmento de 42 kDa ligado à porção GPI C-terminal (MSP1<sub>42</sub>), sob a forma de um complexo de polipeptídios. Quando o merozoíto é liberado, o fragmento MSP1<sub>42</sub> ligado à membrana sofre clivagem proteolítica secundária, originando o fragmento MSP1<sub>33</sub> da região N-terminal, que é solúvel, sendo liberado juntamente com o restante do complexo, e o fragmento MSP1<sub>19</sub> da região C-terminal, que permanece na superfície do merozoíto durante a invasão, é carregado para a nova hemácia invadida. MSP1<sub>19</sub> e MSP1<sub>42</sub> são candidatos à vacina.

Os merozoítos de *P. vivax* expressam uma proteína de superfície equivalente à PfMSP1, conhecida como PvMSP1,<sup>73</sup> e seu mecanismo de processamento é semelhante ao da PfMSP1. Recentemente, os genes MSP1 de *P. ovale* e *P. malariae* foram clonados e sequenciados<sup>74</sup> e a proteína MSP1<sub>19</sub> foi expressa em *Escherichia coli*.<sup>75</sup>

Metanálise de estudos de coorte mostrou que indivíduos com anticorpos IgG contra MSP1<sub>19</sub> apresentavam 18% de redução no risco de ter malária sintomática por *P. falciparum* em relação aos não respondedores. Indivíduos com anticorpos



IgG anti-MSP3-Ct tiveram risco de malária sintomática 54% menor que os sem anticorpos detectáveis. Anticorpos contra os antígenos AMA1 e MSP3 também se mostraram protetores contra malária sintomática.<sup>71</sup>

### Pesquisa de anticorpos contra antígenos do estágio eritrocítico assexuado

A pesquisa de anticorpos contra antígenos do estágio eritrocítico assexuado tem diferentes aplicações, dependendo da região considerada. Em áreas em que a malária não é endêmica, sua principal indicação está na triagem de doadores em bancos de sangue, elucidação de casos clínicos indefinidos, malária críptica e detecção de assintomáticos. Em áreas endêmicas, são úteis para medir o grau de endemicidade da doença, delinear as zonas com transmissão e avaliar a eficiência de medidas de controle, tendo uma aplicação importante na avaliação das tendências a longo prazo e nas mudanças da transmissão da malária, na complementação de métodos malariométricos convencionais.

Estes anticorpos são produzidos de 1 a 14 dias após o início da infecção e são detectáveis por períodos variáveis. Indivíduos que residiram em áreas endêmicas e contraíram malária por repetidas vezes apresentam níveis de anticorpos elevados, que podem perdurar por longos períodos de tempo mesmo após a cura. Testes imunoenzimáticos empregando antígenos nativos e recombinantes podem ser sensíveis e específicos na detecção de anticorpos circulantes, embora nem sempre se correlacionem com parasitemia, o que dificulta sua utilização para fins de diagnóstico de rotina.

Desde a década de 1960, vários testes sorológicos foram padronizados e utilizados para a pesquisa de anticorpos contra estágios eritrocíticos de plasmódios, mas muitos desses não são mais utilizados. A adaptação e o desenvolvimento do cultivo *in vitro* de *P. falciparum* foi um grande avanço para a obtenção de antígenos apropriados para os testes sorológicos, pois antes do cultivo *in vitro*, os antígenos eram obtidos a partir do sangue de pessoas infectadas ou do sangue de animais infectados com espécies heterólogas de plasmódios.

O teste de *imunofluorescência indireta* (IFI) tem sido considerado referência no sorodiagnóstico e na soropidemiologia da malária. Nele são utilizadas lâminas de fluorescência com suspensões de hemácias infectadas íntegras como antígeno. Ferreira e Sanchez, introduzindo modificações na técnica, propuseram a otimização do teste IFI para normatização dos resultados.<sup>76,77</sup> Variáveis devem ser consideradas para a obtenção de resultados reprodutíveis, como:

- Fonte de antígeno (de preferência, maior proporção de esquizontes)
- Preparação e conservação dos antígenos nas lâminas
- Diluente dos soros
- Qualidade do microscópio e a fonte de iluminação UV.

Como alternativa à IFI, o teste *imunoenzimático* (*enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) para pesquisa de anticorpos na malária foi introduzido por Voller e Draper.<sup>78</sup> Diferentes reagentes têm sido estudados para a solubilização e extração de antígenos plasmodiais somáticos das hemácias infectadas, como solução salina, NaOH, agentes caotrópicos (p. ex., ureia) e detergentes (anfóteros, iônicos e não iônicos). Também diferentes variáveis do ELISA têm sido padronizadas, método indireto, amplificação com o sistema biotina-avidina-peroxidase e DOT-ELISA. Antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos de proteínas específicas do estágio eritrocítico também têm sido usados em ELISA.

Vários estudos foram realizados empregando *PvMSP1<sub>19</sub>* e *PfMSP1<sub>19</sub>* demonstrando que é a parte mais imunogênica da molécula e que os anticorpos específicos estão associados a episódios recentes de malária<sup>79-81</sup> e desempenham um importante papel na imunidade à doença,<sup>82-84</sup> sendo a única região da MSP1 capaz de ter efeito de reforço nas reinfecções.

Empregando o teste ELISA com *PvMSP1<sub>19</sub>* na pesquisa de anticorpos IgG em pacientes primoinfectados por *P. vivax* foi obtida sensibilidade de 90,9 a 95,9%.<sup>85,86</sup> No Gabão, o ELISA com *PfMSP1<sub>19</sub>* forneceu positividade de 92,0 a 95,8%, em crianças com malária não grave.<sup>87</sup>

Muerhoff *et al.*<sup>75</sup> combinaram em um único ensaio imunoenzimático proteínas recombinantes MSP1<sub>19</sub> de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, demonstrando o aumento da eficiência na detecção de anticorpos na malária quando se empregam as espécies de *Plasmodium* que ocorrem na região estudada.

A técnica de *Western blotting*, a qual permite a detecção de anticorpos com especificidade para diferentes proteínas, também tem sido utilizada no estudo da resposta imune-humoral na malária.<sup>88</sup>

### Anticorpos contra antígenos do estágio eritrocítico sexuado

Os anticorpos contra antígenos do estágio eritrocítico sexuado podem reduzir a prevalência ou longevidade dos gametócitos e também sua infectividade, impedindo a fertilização ou desenvolvimento dos zigotos no intestino do mosquito. Essa atividade de redução da transmissão é observada em soros de indivíduos naturalmente expostos e tem sido correlacionada a anticorpos contra os antígenos *Pfs230* e *Pfs48/45*. Esses antígenos são expressos em gametócitos circulantes no sangue humano e na superfície dos gametas e estão envolvidos na fertilização dos macrogametócitos e dos microgametas.

Diferentes testes sorológicos, como IFI, RIE e EIE, podem ser utilizados na detecção desses anticorpos. Na IFI, suspensão de gametas é utilizada como antígeno e no EIE e RIE, podem ser utilizados desde antígenos de gametas brutos a antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos de proteínas específicas, como *Pf48/45* e *Pf230*. Em estudo realizado na Tanzânia em indivíduos com parasitemia, foram detectados anticorpos contra os antígenos das formas sexuadas *Pfs230* e *Pfs48/45*, em 20,7 e 15,2% das amostras, respectivamente. A prevalência desses anticorpos aumentou com o tempo de exposição aos gametócitos; a vida média era de aproximadamente três meses e foi observada associação forte entre prevalência, concentração dos anticorpos e atividade de redução da transmissão.<sup>89</sup>

### Anticorpos contra esporozoítos

Anticorpos antiesporozoíto são indicadores de transmissão e têm sido bastante usados em estudos epidemiológicos para estimar o nível de malária em áreas endêmicas. Sabe-se que pessoas que vivem nessas áreas endêmicas de malária, expostas a infecções por esporozoítos, desenvolvem anticorpos específicos para as sequências repetitivas de epitopos da proteína circunsporozoíta (CSP).<sup>90</sup>

A CSP é a principal proteína de revestimento do esporozoíto, recobrando toda a sua superfície, sendo encontrada, portanto, na fase pré-eritrocítica do ciclo. É expressa no esporozoíto extracelular e nos estágios hepáticos intracelulares do parasito. Apresenta uma região central composta por sequências repetidas de aminoácidos altamente imunogênicas e está nas diferentes espécies de *Plasmodium*, não sendo encontrada em outros Apicomplexa. Devido à sua abundância, localização superficial, imunogenicidade e importância na invasão, a CSP



é uma das principais candidatas para o desenvolvimento de uma vacina pré-eritrocítica.<sup>91</sup>

As proteínas CSP das diferentes espécies de *Plasmodium* têm características estruturais comuns entre si, incluindo o peptídeo sinalizador, um domínio central composto de sequências repetidas de aminoácidos e uma região C-terminal hidrofóbica.<sup>92</sup>

### Pesquisa de anticorpos contra esporozoítos

A pesquisa de anticorpos contra esporozoítos permite determinar as taxas de inoculação de mosquitos e estudar a evolução desses anticorpos antiesporozoítos correlacionando proteção e diversidade individual da resposta imune. Anticorpos anti-CSP estão associados à intensidade de transmissão e ao grau de exposição, dependente da idade.<sup>93</sup> Para a pesquisa desses anticorpos, também os métodos de IFI, RIE e EIE têm sido os mais utilizados. Esporozoítos íntegros são usados como antígeno na IFI. Com o sequenciamento da proteína circunsporozoíta (CSP) de diversas espécies plasmodiais, peptídeos sintéticos (lineares ou antígenos peptídios múltiplos – MAP) e recombinantes foram produzidos e utilizados em RIE ou ELISA.<sup>94,95</sup>

### ■ Testes funcionais do estado imune

Vários testes funcionais estão disponíveis para avaliação do estado imune de um indivíduo ou de populações, como:

- Inibição da invasão de hepatócitos pelo esporozoíto
- Inibição do desenvolvimento do estágio hepático
- Determinação da imunidade celular, por linfoproliferação, dosagem de citocinas ou pela determinação de proteção de anticorpos dependente de células T
- Avaliação de imunossupressão
- Fenotipagem de células
- Análise da síntese de fatores de crescimento e receptores
- Análise de funções efetoras mediadas por células
- Inibição da formação de rosetas
- Inibição de invasão de hemácias pelo merozoíto
- Determinação da atividade respiratória de neutrófilos dependente de anticorpos.

### ■ Métodos para pesquisa do esporozoíto no mosquito

Em última análise, a transmissão da malária depende da taxa de inoculação de esporozoítos pelos mosquitos vetores. Portanto, a determinação da ocorrência de esporozoítos nas glândulas salivares dos mosquitos *Anopheles* capturados na natureza é um fator importante em estudos epidemiológicos em áreas endêmicas de malária e na concepção de medidas de controle. Vários métodos estão disponíveis, como:

- Detecção de esporozoítos por microscopia direta após dissecação ou após isolamento em gradiente de densidade, filtração em membrana ou centrifugação de gradiente
- Detecção de antígenos por métodos imunológicos usando anticorpos monoclonais contra a CSP das diferentes espécies de *Plasmodium*
- Detecção de material genético de *Plasmodium* por métodos moleculares, como a PCR.

O método clássico para pesquisa de esporozoítos no mosquito consiste na dissecação de glândulas salivares e exame microscópico. No entanto, a dissecação da glândula salivar é

impraticável quando um grande número de mosquitos deve ser processado. Além disso, exige grande experiência do laboratorista e gradualmente dá lugar a métodos de mais fácil padronização e automação.<sup>96</sup>

A pesquisa da proteína CS utilizando anticorpos monoclonais foi introduzida como uma alternativa ao exame microscópico. Apresenta sensibilidade e especificidade elevadas e permite a quantificação dos parasitos. Tem sido aceita como padrão-ouro na identificação de plasmódios em mosquitos. Entretanto, exige a utilização de vários anticorpos monoclonais, pois a CSP pode variar em função da área geográfica. Dependendo do estudo, a sensibilidade varia entre 200 e 400 esporozoítos<sup>97</sup> – 50 esporozoítos por mosquito.<sup>98</sup>

O VecTest® Malária é um teste imunocromatográfico para detecção de esporozoítos em mosquitos, que apresenta a vantagem de permitir leitura visual após 15 min. É semelhante ao CS-ELISA e detecta epitopos específicos da proteína CS de *P. falciparum* e *P. vivax*.<sup>98,99</sup>

Nos últimos anos, a PCR tem sido muito utilizada para amplificar sequências específicas de DNA de *Plasmodium* para a detecção de esporozoítos nos mosquitos e tem se mostrado um método mais sensível para o diagnóstico das quatro espécies de parasitos da malária humana, tendo sido empregada em vários estudos de campo.<sup>96,100,101</sup>

A técnica de PCR *multiplex* pode detectar menos de 10 esporozoítos nas glândulas salivares dos anofelinos, além de diferenciar, em uma única amplificação, as quatro principais espécies de *Plasmodium* no caso de infecções simples ou mistas.<sup>102</sup> A Cytb-PCR também pode detectar 10 esporozoítos.<sup>101</sup> A *nested*-PCR pode detectar três esporozoítos por mosquito.<sup>103</sup> A PCR em tempo real apresenta resultados promissores.<sup>104</sup>

## ► Malária transmitida por transfusão

O primeiro caso de malária transmitida por transfusão (MTT) foi relatado em 1911,<sup>105</sup> permanecendo no contexto mundial como uma das infecções induzidas mais comuns.<sup>6</sup> A MTT pode ocorrer a partir de hemácias, plaquetas, concentrados de leucócitos e crioprecipitados, não tendo sido relatado caso a partir de plasma congelado. Os parasitos da malária podem sobreviver em hemácias estocadas entre 2 e 6°C por até três semanas, sendo o inóculo estimado nas transfusões de 1 a 10 parasitos por unidade de sangue.

Considerando as áreas endêmicas e não endêmicas, diferentes estratégias devem ser seguidas no controle da MTT. Em áreas endêmicas, a triagem dos doadores pode ser realizada por meio da gota espessa corada pelo Giemsa, por testes rápidos para a pesquisa de antígenos ou pela PCR.<sup>6</sup> Em áreas não endêmicas, a triagem por meio de questionário para identificar indivíduos com risco de transmitir malária, excluindo aqueles que relatem ter viajado para ou procedam de áreas endêmicas, pode permitir a coleta de sangue de um paciente com a doença, devido a falhas de informação por parte do candidato à doação.<sup>6</sup> Além disso, o escasso conhecimento sobre a malária em áreas sem transmissão ativa e a desinformação com relação à distribuição geográfica da enfermidade podem determinar equívocos na triagem epidemiológica por questionários.<sup>106</sup> Embora este tipo de triagem não seja suficiente para seleção do doador, ela é importante e deve contemplar aspectos como: deslocamentos ou residência pregressa em área endêmica; período de residência em área de malária, visto que, quanto maior o tempo de residência, maior a imunidade e possibili-



dade de casos assintomáticos; período fora da área de malária, que deve ser, no mínimo, de seis meses; história de malária anterior.

No Brasil, a regulamentação para bancos de sangue que está em vigor é a Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, da Anvisa, publicada no *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, de 24 de junho de 2004.<sup>107</sup> A inabilitação para o ato de doar sangue deve ocorrer segundo os critérios estabelecidos a partir da incidência da doença no local, usando-se como critério de referência o índice parasitário anual – IPA – fornecido por órgão oficial. Nas áreas endêmicas devem ser rejeitados doadores que tiveram malária nos últimos 12 meses precedentes à doação, os procedentes de áreas de alto risco, os indivíduos febris e os suspeitos de terem tido malária nos últimos 30 dias. Nas áreas de médio e baixo risco são aceitos os doadores que apresentaram gota espessa ou teste rápido negativos. Nas áreas não endêmicas devem ser excluídos os doadores com deslocamento para áreas de transmissão ativa nos seis meses precedentes à doação e os que tiveram malária ou residiram em áreas endêmicas nos últimos três anos. Porém, nenhum teste é recomendado. Doadores que relatem infecção por *P. malariae* devem ser permanentemente excluídos tanto nas áreas endêmicas como não endêmicas.

A MTT está diretamente relacionada com doadores semi-imunes, com baixos níveis de parasitemia e ausência de sintomas. Como resultado da persistência assintomática dos parasitos, foi documentada a transmissão, 53 anos após a última exposição por *P. malariae*, 27 anos por *P. vivax* e 13 anos por *P. falciparum*.<sup>108</sup> Nos últimos 10 anos foram notificados vários casos de MTT, sendo dois na França;<sup>109</sup> dois na Itália; quatro em São Paulo (Brasil);<sup>110-112</sup>; um nos EUA;<sup>113</sup> um na República da Coreia;<sup>114</sup> um na Suíça; e um no Reino Unido.<sup>115</sup> De acordo com a rede de hemovigilância da França e do Reino Unido, nenhum dos casos de MTT foi devido a falhas na triagem sorológica, realizada de rotina em ambos os países. Nos quatro casos de MTT ocorridos em São Paulo, portadores assintomáticos doaram sangue, resultando em contaminação dos receptores e um óbito por *P. malariae*.<sup>111-112</sup> Nenhum dos doadores relatou viagem à região Amazônica, mas todos apresentavam deslocamentos por regiões de Mata Atlântica, onde ocorrem casos esporádicos de malária autóctone com baixas parasitemias.

Kitchen e Chiodini<sup>6</sup> recomendam o emprego do teste imunoenzimático ELISA, juntamente com uma entrevista do doador, como método de triagem para malária em áreas não endêmicas. Indivíduos que residiram em áreas endêmicas e contraíram a doença repetidas vezes têm níveis de anticorpos elevados, que podem perdurar por longos períodos de tempo mesmo após a cura. Esses indivíduos seriam excluídos da doação, critério que confere maior segurança à triagem, pois testes sorológicos apresentam boa sensibilidade em indivíduos imunes, que são os doadores de risco, pois podem estar pauciparasitados e assintomáticos.<sup>116</sup>

Bancos de sangue de países não endêmicos têm discutido medidas para prevenção da MTT. Em alguns países, doadores que tenham tido malária no passado, vivido ou viajado para áreas endêmicas são excluídos definitivamente da doação. Em outros, a elegibilidade é restaurada se não forem detectados anticorpos após o período estabelecido de rejeição do doador.

Desde 1986, a França vem adotando autoexclusão, questionário, entrevista clínica e triagem sorológica como estratégia na seleção de doadores, levando à redução de 5 a 10 vezes no número de casos. De acordo com as redes de hemovigilância da França, nenhum caso de MTT foi decorrente de falhas nos testes sorológicos.<sup>109</sup> Austrália, Reino Unido, Dinamarca, Finlândia e Nova Zelândia também utilizam como rotina a triagem sorológica para malária em doadores de risco. Os casos de sorologia positiva são confirmados por testes rápidos na Nova Zelândia e por NAT (testes para ácidos nucleicos) no Reino Unido, onde não houve nenhum caso de MTT nos últimos cinco anos.<sup>113</sup> Atualmente, bancos de sangue de vários países não endêmicos estão estudando a adoção da sorologia para malária.<sup>109</sup>

Portanto, uma estratégia adequada para minimizar o risco de malária transfusional em áreas não endêmicas é a combinação de métodos adequados de seleção e exclusão de doadores, associados à triagem de anticorpos para malária. Os testes sorológicos preferencialmente utilizados atualmente são ELISA com antígenos recombinantes ou extratos de *P. falciparum* e *P. vivax*, e IFI. Recentemente foi desenvolvido um novo ensaio imunoenzimático com base na pesquisa de anticorpos anti-MSP1<sub>19</sub> de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax* que apresenta a vantagem de utilizar ao mesmo tempo antígenos para quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o homem, aumentando a sensibilidade do ensaio.<sup>75</sup>

## ► Conclusão

Diferentes parâmetros devem ser observados na padronização de métodos para o diagnóstico de laboratório, tais como: sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, facilidade de automação e custo acessível.

Em termos de diagnóstico precoce, as melhores perspectivas são para estudos com componentes antigênicos definidos, objetivando testes simples e passíveis de automação. O uso universal do método da gota espessa deve ser reavaliado sistematicamente quando métodos alternativos são apresentados como candidatos ao diagnóstico da malária. Efetivamente, ainda são poucos os métodos que apresentam condições em nível de praticidade e sensibilidade que justifiquem a substituição da gota espessa. Quando um novo método surge, o custo deste é a preocupação inicial, principalmente por ser a malária uma doença que afeta populações empobrecidas, com poucos recursos para gastos laboratoriais e ser de responsabilidade do governo. Esse custo é sempre analisado em relação ao custo direto de um teste, que em geral é superior ao custo de uma gota espessa. O que também deve ser avaliado é o custo de infecções não detectadas, aumento e continuidade da transmissão da doença, alta morbidade que acarreta prejuízos econômicos, pacientes graves de malária internados em hospitais, o que provavelmente seria evitado se testes mais sensíveis fossem utilizados, que detectassem precocemente a infecção, mesmo com parasitemias muito baixas.

O Quadro 24.5 oferece sugestões para o diagnóstico individual, seleção de doadores de sangue e acompanhamento terapêutico, com base em observações e nos dados relatados na literatura. A variedade de testes para estudos epidemiológicos é muito ampla, dependendo de cada objetivo, e já foram discutidos detalhadamente.



**Quadro 24.5 • Sugestões para normatização do diagnóstico da malária humana no Brasil.**

Finalidade	Áreas	Método diagnóstico
Diagnóstico individual	Endêmicas e não endêmicas	Pesquisa do plasmódio: gota espessa (esfregaço para confirmação de casos duvidosos quanto à espécie), PCR ou QBC®/testes rápidos em locais com dificuldades diagnósticas
Seleção de doadores de sangue	Endêmicas	PCR, QBC® ou gota espessa
	Não endêmicas	Pesquisa de anticorpos IgG – IFI ou ELISA – e confirmatório dos casos positivos – PCR ou QBC®
Acompanhamento terapêutico	Endêmicas e não endêmicas	Gota espessa, PCR ou QBC®

## Referências bibliográficas

- Bruce-Chwatt LJ. In: Essential Malariology, 2ed., William Heisemann Medical Books, London, 1985.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 2004; 363:1017-24.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS *et al.* *P. knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis 2008; 46:165-71.
- WHO – World Health Organization. World malaria report 2010. [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010).
- Centers for Disease Control and Prevention. Malaria surveillance – United States, 2005. Morbid Mortal Wkly Rep 2007; 56:23-38.
- Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. Vox Sang 2006; 90:77-84.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portal da saúde. Malária. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab\\_casos\\_confirmados\\_malaria\\_bra\\_gr\\_e\\_uufs\\_90-09.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_confirmados_malaria_bra_gr_e_uufs_90-09.pdf)
- WHO – World Health Organization. Malaria diagnosis meeting. New Perspectives. Report of a Joint WHO/USAID Informal Consultation, 25-27 October 1999. WHO/MAL/2000.
- Greenwood BM. Asymptomatic malaria infections do they matter? Parasitol Today 1987;3:206-14.
- WHO – World Health Organization. Malaria diagnosis. Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 1988; 66:575-94.
- Knell AJ (Ed.) Malaria. Oxford, Oxford Univ. Press, 1991.
- Hanscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clin Lab Haem 1999; 21:235-45.
- Ross R. An improvement method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. Lancet 1903; 1:86-7.
- Bruce-Chwatt LJ. From Laveran's discovery to DNA probes: new trends in diagnosis of malaria. Lancet 1987; 2:1509-11.
- Dowling MAC, Shute GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitemia. Bull WHO 1966; 34: 249-67.
- Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosis malaria at the primary health care level. Bull WHO 1988; 66:621-26.
- Wardlaw SC, Levine RA. Quantitative buffy coat analysis. A new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. J Am Med Assoc 1983; 249:617.
- Spielman A, Perrone B, Teklehaimanot A *et al.* Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. Am J Trop Med Hyg 1988; 39:337-42.
- Moraes-Ávila SL, Leandro MC, Arruk VG *et al.* Evaluation of different methods for *Plasmodia* detection in well defined population groups in an endemic area of Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1994; 36: 157-62.
- Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV *et al.* PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol 2006; 44:1087-89.
- Zimmerman PA, Mehlotra RK, Kasehagen LJ *et al.* Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? Trends in Parasitology 2004; 20:440-7.
- Padley DJ, Heath AB, Sutherland C *et al.* Establishment of the 1st World Health Organization International Standard for *Plasmodium falciparum* DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. Malaria Journal 2008; 7:139.
- Noller HF. Structure of ribosomal RNA. Ann Rev Biochem 1984; 53:119-62.
- Lal AA, Changkasiri S, Hollingdale MR *et al.* Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. Mol Biochem Parasitol 1989; 36:67-72.
- McCutchan TF, Li J, McConkey GA *et al.* The cytoplasmic ribosomal RNAs of *Plasmodium* spp. Parasitol Today 1995; 11:134-8.
- McCutchan TF, Cruz VF de la, Lal AA *et al.* Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1988; 28:63-8.
- Li J, Wirtz RA, McConkey GA *et al.* *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantitation. Exp Parasitol 1995; 81:182-90.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W *et al.* Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993; 58:283-92.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61:315-20.
- Kimura M, Kaneko O, Liu Q *et al.* Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitol Int 1997; 46:91-5.
- Oliveira DA, Shi YP, Oloo AJ *et al.* Field evaluation of polymerase chain reaction-based nonisotopic liquid hybridization assay for malaria diagnosis. J Infect Dis 1996; 173:1284-7.
- Kimura M, Miyake H, Kim HS *et al.* Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. J Clin Microbiol 1995; 33:2342-6.
- Rubio JM, Benito A, Roche J *et al.* Seminested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:183-87.
- Singh B, Cox-Singh J, Miller OA *et al.* Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90:519-21.
- Postigo M, Mendoza-León A, Pérez HA. Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92:509-11.
- May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG *et al.* High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. Am J Trop Med Hyg 1999; 61:339-43.
- Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W *et al.* Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg 2000; 62:225-31.
- Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A *et al.* Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malar J 2002; 1:2.
- Laoboonchai A, Kawamoto F, Thanosingha N *et al.* PCR-based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. Trop Med Int Health 2001; 6:458-62.
- Zhou M, Liu Q, Wongsrichanalai C *et al.* High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. Trop Med Int Health 1998; 3:304-12.
- Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F *et al.* How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33:489-92.
- Toma H, Kobayashi J, Vannachone B *et al.* A field study on malaria prevalence in southeastern Laos by polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 2001; 64:257-61.
- Kanunfre K. Desempenho de metodologia molecular no diagnóstico da malária em amostras de sangue de indivíduos de área endêmica do Brasil. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 1993.
- Bourgeois N, Boutet A, Bousquet P-J *et al.* Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium* sp. Infection. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1305-11.
- Malhotra I, Dent A, Mungai P *et al.* Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. J Clin Microbiol 2005; 43:3630-5.
- Swan H, Sloan L, Muyombwe A *et al.* Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. Am J Trop Med Hyg 2005; 73:850-4.



47. Mangold KA, Manson RU, Koay ES *et al.* Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J Clin Microbiol 2005; 43:2435-40.
48. Mens P, Spieker N, Omar S *et al.* Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. Trop Med Int Health 2007; 12:238-44.
49. Boonma P, Christensen PR, Suwanarusk R *et al.* Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Malar J 2007; 6:124.
50. Gama BE, Silva-Pires FE, Lopes MN *et al.* Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. Exp Parasitol 2007; 116:427-32.
51. Veron V, Simon S, Carme B. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. Exp Parasitol 2009; 121:346-51.
52. Divis PCS, Shokoples SE, Singh B *et al.* A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. Malar J 2010; 9:344.
53. McGregor IA, Williams K, Hall P. Soluble antigens in the blood of African patients with severe *Plasmodium falciparum* malaria. Lancet 1968; 2:881-4.
54. WHO – World Health Organization. WHO Global Malaria Programme. Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria. 2011.
55. Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN. The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87:646-8.
56. Beadle C, Long GW, Weiss WR *et al.* Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. Lancet 1994; 343:564-8.
57. Kilian AH, Kabagambe G, Byamukama W *et al.* Application of the ParaSight-F dipstick test for malaria diagnosis in a district control program. Acta Trop 1999; 72:281-93.
58. Garcia M, Kirimoama S, Marlborough D *et al.* Immunochromatographic test for malaria diagnosis. Lancet 1996; 347:1549.
59. Tjitra E, Suprianto S, Dyer M *et al.* Field evaluation of the ICT malaria Pf/Pv immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. J Clin Microbiol 1999; 37: 2412-7.
60. Avila PE, Kirchgatter K, Brunialti KCS *et al.* Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-Check™, for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44:293-6.
61. Piper R, Lebras J, Wentworth L *et al.* Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). Am J Trop Med Hyg 1999; 60:109-18.
62. Mason DP, Kawamoto F, Li K *et al.* A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. Acta Trop 2002; 82:51-9.
63. Premji Z, Minjas JN, Shiff CJ. Laboratory diagnosis of malaria by village health workers using the rapid manual ParaSight-F test. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88:418.
64. WHO – World Health Organization. New perspectives: malaria diagnosis. Report of a joint WHO/CDS/RBM/2000.14 and WHO/MAL/2000.1091, Geneva, 2000.
65. Quintana M, Piper R, Boling HL *et al.* Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:868-71.
66. Miller RS, McDaniel P, Wongsrichanalai C. Following the course of malaria treatment by detecting parasite lactate dehydrogenase enzyme. Br J Haematol 2001; 113:558-9.
67. Iqbal J, Khalid N, Hira PR. Performance of rapid malaria Pf antigen test for the diagnosis of malaria and false-reactivity with autoantibodies. Adv Exp Med Biol 2003; 531:135-48.
68. Jelinek T, Grobusch MP, Nothdurft HD. Use of dipstick tests for the rapid diagnosis of malaria in nonimmune travelers. J Travel Med 2000; 7:175-9.
69. Houzé S, Hubert V, Le Pessec G *et al.* Combined deletions of pfrp2 and pfrp3 genes result in *Plasmodium falciparum* Malaria False-Negative Rapid Diagnostic Test. J Clin Microbiol 2011, May 4. [Epub ahead of print]
70. WHO – World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing malaria RDTs: round 2 (2009), 2010.
71. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA *et al.* The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. PLoS Med 2010; 19;7(1):e1000218.
72. Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. Prog Allergy 1988; 41:72-97.
73. del Portillo HA, Longacre S, Khouri E *et al.* Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88:4030-4.
74. Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ *et al.* Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. Am J Trop Med Hyg 2010; 82:996-1003.
75. Muerhoff AS, Birkenmeyer LG, Coffey R *et al.* Detection of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae* merozoite surface protein 1-p19 antibodies in human malaria patients and experimentally infected nonhuman primates. Clin Vac Immunol 2010; 17:1631-38.
76. Sanchez MCA, Quartier VP, di Santi SM *et al.* Otimização do teste de imunofluorescência indireta na sorologia da malária humana. Rev Soc Bras Med Trop 1987; 20:69-70.
77. Ferreira AW, Sanchez MCA. Malária humana: Padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos epidemiológicos. Rev Inst Med Trop São Paulo 1989; 31:526.
78. Voller A, Draper CC. Immunodiagnosis and seroepidemiology of malaria. Br Med Bull 1982; 38:173-7.
79. Soares IS, Cunha MG, Silva MN *et al.* Longevity of the naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *P. vivax* MSP1. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:357-63.
80. Moraes CG, Soares IS, Carvalho LH *et al.* IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. Parasitol Res 2005; 95:420-6.
81. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA *et al.* Duration of naturally acquired antibody responses to blood stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. Infect Immun 2008; 76:1748-55.
82. Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F *et al.* Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). Microbes Infect 2006; 8(8):2130-7.
83. Bargieri DY, Leite JA, Lopes SCP *et al.* Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. Vaccine 2010; 28:2818-26.
84. Lazarou M, Patiño JA, Jennings RM *et al.* Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. Infect Immun 2009; 77(12):5659-67.
85. Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD *et al.* Serological detection of *Plasmodium vivax* using recombinant of the merozoite surface protein-1. Malaria J 2003; 2:39-45.
86. Kudó ME. Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de *P. vivax* (MSP1<sub>19</sub>) em grupos populacionais expostos à malária. São Paulo. (Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Experimental. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), 2006.
87. Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron P. Correlations between treatment outcome and both anti-MSP1<sub>19</sub> antibody response and erythrocyte-related genetic factors in *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Genet Evol 2007; 7:147-54.
88. Thelu J, Sheick-Zakiuddin I, Boudin C *et al.* Development of natural immunity in *Plasmodium falciparum* malaria: study of antibody response by Western blotting. J Clin Microbiol 1991; 29:510-518.
89. Bousema T, Roeffen W, Meijerink H *et al.* The dynamics of naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs230 & Pfs48/45 in a low endemic area in Tanzania. PLoS One 2010; 5(11):e14114.
90. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RMC *et al.* Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. Rev Saúde Publ 2007; 367-72.
91. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. Adv Immunol 1989; 145:283-334.
92. McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG *et al.* Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. Proc Acad Natl Sci USA 1996; 93(21):11889-94.
93. Carter R, Mendis K. Transmission immunity in malaria: reflections on the underlying immune mechanisms during natural infections and following artificial immunization. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87(supl.3):169-73.
94. Del Giudice G, Douglas A, Verhave JP *et al.* Comparative analysis of ELISAs employing repetitive peptides to detect antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites. Bull WHO 1989; 67:515-23.
95. Franke ED, Lucas CM, Chauca G *et al.* Antibody response to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in naturally infected humans. Am J Trop Med Hyg 1992; 46:320-26.



96. Oh SS, Hur MJ, Joo GS *et al.* Malaria Vector Surveillance in Ganghwa-do, a Malaria-Endemic Area in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 2010; 48:35-41.
97. Ryan JR, Dave K, Collins KM *et al.* Extensive multiple test centre evaluation of the VecTest™ malaria antigen panel assay. *Med Vet Entomol* 2002; 16:321-7.
98. Appawu MA, Bosompem KM, Dadzie S *et al.* Detection of malaria sporozoites by standard ELISA and VecTest™ dipstick assay in field-collected anopheline mosquitoes from a malaria endemic site in Ghana. *Trop Med Int Health* 2003; 8:1012-17.
99. Ryan JR, Dave K, Emmerich E *et al.* Dipstick for rapid detection of *Plasmodium* in vectoring Anopheles mosquitoes. *Med Vet Entomol* 2001; 15:225-30.
100. Swain S, Mohanty A, Mahapatra N *et al.* The development and evaluation of a single step multiplex PCR for simultaneous detection of *Anopheles annularis* group mosquitoes, human host preference and *Plasmodium falciparum* sporozoite presence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:1146-52.
101. Hasan AU, Suguri S, Sattabongkot J *et al.* Implementation of a novel PCR based method for detecting malaria parasites from naturally infected mosquitoes in Papua New Guinea. *Malar J* 2009; 8:182.
102. Padley D, Moody D, Moody AH *et al.* Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97:131-7.
103. Li F, Niu C, Ye B. Nested polymerase chain reaction in detection of *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes. *Clin Med J (Engl)* 2001; 114:654-7.
104. Bass C, Nikou D, Blagborough AM *et al.* PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar J* 2008; 7:177.
105. Woolsey G. Transfusion for pernicious anaemia: two cases. *Ann Surg* 1911; 53:132-5.
106. Sáez-Alquézar A, Ramos AMSV, Di Santi SM *et al.* Controle da malária transfusional em região endêmica e não endêmica no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31:27-34.
107. Brasil. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, da Anvisa, que "Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea". Publicada no Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de junho de 2004.
108. Seed CR, Kitchen A, Davis TME. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transf Med Rev* 2005; 19:229-40.
109. Garraud O, Assal A, Pelletier B *et al.* Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France. *Vox Sang* 2008; 95:226-31.
110. Di Santi SM, Carvalho ME, Costa MJ *et al.* Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Rev Soc Brasil Med Trop* 2005; 38:333, Abstract PR75.
111. Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A *et al.* Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *BMJ*. 2005; 331: 576-b.
112. Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA *et al.* Transfusion transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2011; 53:55-9.
113. Reesink HW, Panzer S, Wendel S *et al.* The use of malaria antibody tests in the prevention of transfusion-transmitted malaria. *Vox Sang* 2010; 98:468-78.
114. Lee YH, Lee HK, Choi KH *et al.* Transfusion-induced malaria in a child after open heart surgery in Korea. *J Korean Med Sci* 2001; 16:789-91.
115. Kitchen A, Mijovic A, Hewitt P. Transfusional transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient. *Vox Sanguinis* 2005; 88:200-1.



## Capítulo 25

---

# Protozooses Emergentes

*Pedro Paulo Chieffi*

- Introdução, 301
- *Cryptosporidium* spp., 301
- *Cyclospora cayetanensis*, 301
- Microsporídeos, 302
- Referências bibliográficas, 303



## ► Introdução

Nas últimas décadas, observou-se, com frequência variável, porém com ampla distribuição geográfica, o acometimento de seres humanos por infecções parasitárias antes quase somente restritas a animais inferiores, bem como a ocorrência de infecções humanas por espécies ainda não descritas.

Alguns desses patógenos revelaram caráter oportunista inequívoco e eram encontrados apenas em pacientes submetidos a processos de imunodepressão. Outros foram igualmente diagnosticados em indivíduos imunocompetentes, variando, todavia, sua capacidade de produzir alterações patológicas conforme o grau de competência do sistema imunológico do hospedeiro, como se observa nas infecções humanas por *Cryptosporidium* spp. ou *Cyclospora cayetanensis*.

O surgimento da síndrome de imunodeficiência adquirida consequente à infecção humana pelo HIV-1/HIV-2, além do número elevado de indivíduos imunodeprimidos em decorrência de enfermidades ou de transplante de órgãos sólidos ou de medula óssea, criaram condições favoráveis à ocorrência de infecções por tais patógenos, em frequência apreciável.<sup>1</sup> Diversos outros fatores têm contribuído para aumentar a importância desse tipo de infecção em nossos dias.<sup>2</sup> Assim, o incremento observado na vida média das populações dos países desenvolvidos e, mesmo em muitos países ainda em processo de desenvolvimento, elevou significativamente o número de idosos, cujo sistema imunológico não apresenta a mesma competência da observada em jovens. Simultaneamente, o importante aumento dos movimentos migratórios tanto nacionais como internacionais criou condições favoráveis à circulação de patógenos, principalmente no caso de refugiados por motivos de ordem política ou econômica, os quais tendem a ser agrupados em acampamentos especiais.

Consequentemente, diversas infecções causadas por vírus, fungos, bactérias, protozoários ou helmintos tornaram-se – e, em certas circunstâncias, voltaram a ser – relevantes, sendo classificadas como emergentes e reemergentes. Neste capítulo, serão abordados os principais aspectos da história natural e do diagnóstico laboratorial de uma parcela dessas infecções, limitando-se às humanas determinadas por *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* e microsporídeos.

## ► *Cryptosporidium* spp.

As espécies do gênero *Cryptosporidium* são protozoários que pertencem ao filo Apicomplexa e ordem Coccidia. *Cryptosporidium parvum*, descrito como parasito de animais inferiores em 1907, somente foi reconhecido infectando seres humanos em 1976 e, até o surgimento dos primeiros casos clínicos de AIDS, a infecção humana por esse coccídeo foi considerada rara. A partir de 1983, muitos pacientes com AIDS e outros tipos de imunodepressão foram identificados apresentando surtos de diarreia causados por *Cryptosporidium* spp.<sup>3</sup> em decorrência do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis de diagnóstico coprológico.<sup>4,5</sup>

Posteriormente, ficou evidente que o *Cryptosporidium* spp. não se limitava a desenvolver comportamento oportunista em pacientes imunodeprimidos, mas era encontrado associado a processos diarreicos autolimitados em indivíduos imunocompetentes.<sup>6,7</sup> Mais recentemente, concluiu-se que, além de *C. parvum*, espécie que apresenta típico comportamento zoonótico, outra espécie denominada *C. homi-*

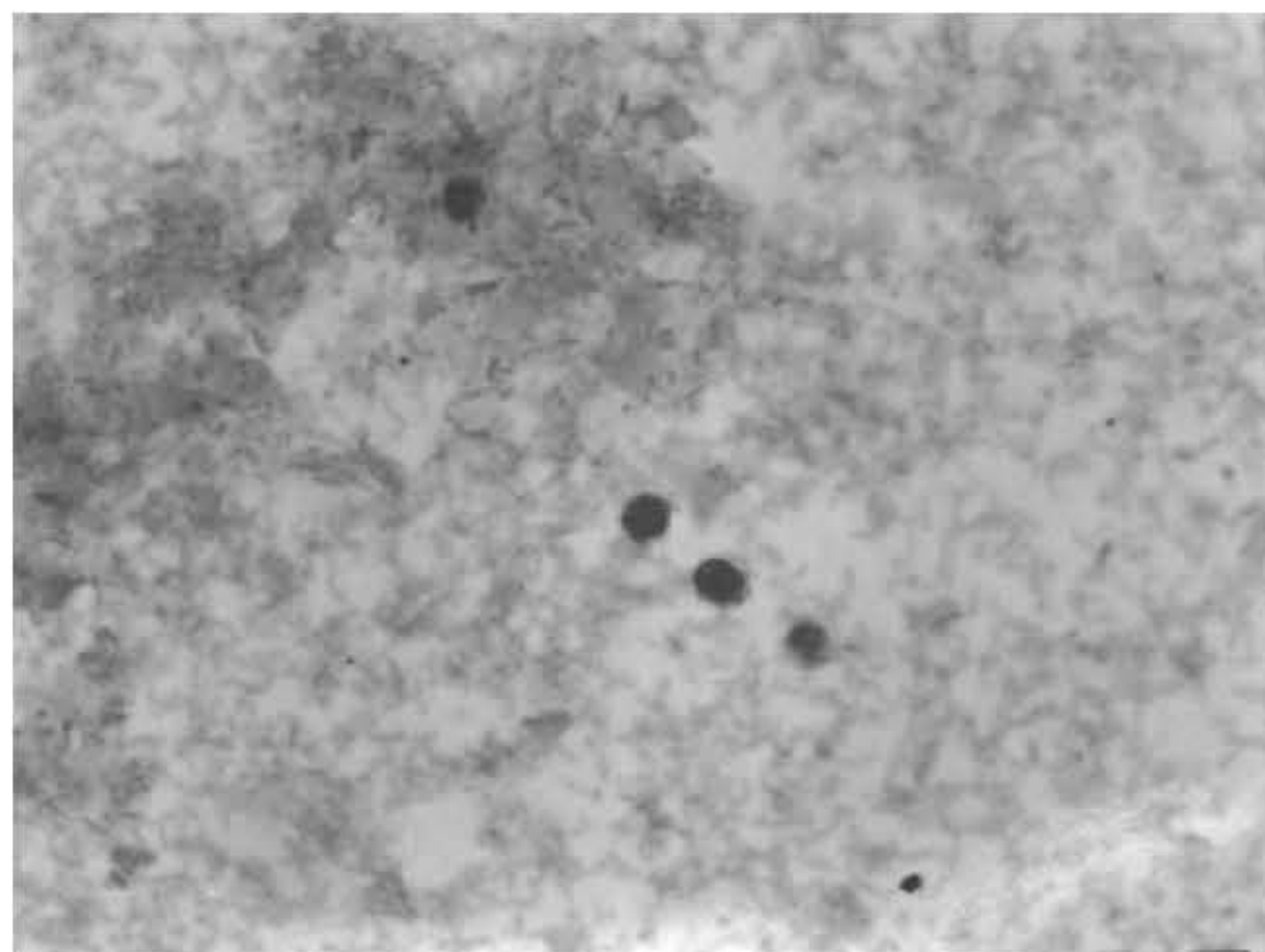
*nis* é responsável por infecções em seres humanos.<sup>8</sup> Embora responsável por ciclos de transmissão antroponótica, essa espécie também já foi isolada em bovinos e caprinos.<sup>9</sup> Em pacientes imunodeprimidos, infecções por outras espécies de *Cryptosporidium*, como *C. felis* e *C. meleagridis*, já foram eventualmente diagnosticadas.<sup>8,9</sup>

A transmissão de infecção por *Cryptosporidium* depende da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos eliminados nas fezes de seres humanos ou animais infectados. A transmissão pode ocorrer, ainda, devido ao contato interhumano ou por aspiração de oocistos presentes em aerossóis, formados a partir de fezes de animais com infecção aguda, uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium* são infectantes já na eliminação pelos hospedeiros infectados, contrariamente ao que sucede com outras espécies de coccídeos.<sup>8</sup>

A identificação de oocistos nas fezes dos indivíduos infectados ainda constitui a maneira mais usada para diagnosticar a criptosporidiose. Esse processo tornou-se viável após a descoberta de que os oocistos de *Cryptosporidium* são corados e facilmente distinguíveis de outras estruturas habitualmente presentes nas fezes, como as leveduras, por meio de corantes álcool-acidorresistentes (Figura 25.1). Diversas técnicas têm sido utilizadas<sup>4,5</sup> e, embora não se saiba com certeza quantas amostras devam ser examinadas para garantir elevada sensibilidade, recomenda-se que, no mínimo, três amostras fecais, colhidas em ocasiões diferentes, sejam empregadas.<sup>10</sup> Outras técnicas de coloração, incluindo imunofluorescência com anticorpo monoclonal, podem ser utilizadas.<sup>11,12</sup> Métodos de imunodiagnóstico,<sup>8</sup> mais úteis em levantamentos epidemiológicos do que no diagnóstico individual, têm sido descritos. Mais recentemente, a obtenção de *primers* permitiu o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico de infecções por *Cryptosporidium* capazes de detectar a existência de pequenas quantidades de oocistos nas fezes e identificar com segurança as espécies envolvidas.<sup>6,8</sup>

## ► *Cyclospora cayetanensis*

*Cyclospora cayetanensis* também é um protozoário classificado no filo Apicomplexa e ordem Coccidia, tendo sido descrito determinando surto diarreico em seres humanos pela primeira vez em 1979, em Nova Guiné.<sup>14</sup> Nessa ocasião,



**Figura 25.1** Oocistos de *Cryptosporidium* spp., em esfregaço de fezes, corado pela técnica de Kinyoun (aumento de 1.000x).



entretanto, não se obteve identificação genérica ou específica do agente envolvido. Mais de uma década após a posição sistemática desse protozoário, criou-se o táxon *Cyclospora cayetanensis*,<sup>15</sup> estabelecendo sua proximidade filogenética com coccídeos do gênero *Eimeria*.<sup>16</sup>

Embora seres humanos sejam considerados a principal fonte de infecção, suspeita-se que *C. cayetanensis* apresente comportamento zoonótico. Já foram relatados episódios de infecção por coccídeos morfologicamente indistinguíveis de *C. cayetanensis* em galinhas<sup>17</sup> e cães.<sup>18</sup> Por outro lado, há longo tempo a infecção de diversos grupos de vertebrados inferiores é conhecida, como répteis e roedores, por outras espécies de *Cyclospora*.<sup>19</sup>

Oocistos de *C. cayetanensis* já foram diagnosticados nas fezes de pacientes imunodeprimidos e imunocompetentes nas Américas, Europa, Ásia e sul da África. Geralmente, os indivíduos infectados apresentam episódios de diarreia; algumas vezes, entretanto, oocistos são encontrados nas fezes de indivíduos assintomáticos.<sup>16</sup>

Além de diarreia aquosa, outras manifestações clínicas, como fadiga intensa, náuseas, vômitos, anorexia, dores abdominais e, mais raramente, febre, costumam estar presentes nos pacientes infectados por *C. cayetanensis*. Já os imunodeprimidos apresentam quadros mais graves e prolongados, às vezes com acometimento de trato biliar, além da localização habitual do parasito na mucosa do intestino delgado.<sup>8,16</sup>

A transmissão da infecção por *C. cayetanensis* ocorre pela ingestão de oocistos veiculados por meio de água (mesmo que previamente clorada) ou alimentos contaminados.<sup>8,16</sup> Diversos episódios de diarreia ocorridos em vários estados norte-americanos e no Canadá nos últimos anos foram associados ao consumo de vegetais e frutas *in natura* (p. ex., framboesa) e à presença de oocistos nas fezes dos indivíduos acometidos.<sup>20,21</sup> Ao contrário do que se verifica no caso de *C. parvum* não há transmissão inter-humana na ciclosporíase, uma vez que os oocistos de *Cyclospora*, após serem eliminados pelas fezes, precisam permanecer alguns dias no solo, em condições favoráveis, para ocorrer a formação dos esporozoítos em seu interior.<sup>21</sup>

Embora testes mais sofisticados, utilizando técnicas de biologia molecular, já estejam disponíveis para o diagnóstico da infecção humana por *C. cayetanensis*,<sup>22</sup> os métodos parasitológicos são ainda os mais utilizados.<sup>21</sup>

Os oocistos de *C. cayetanensis* são, grosso modo, morfologicamente semelhantes aos de *C. parvum*. Três características, de natureza morfológica e biológica,<sup>20,21,33</sup> permitem, todavia, diferenciá-los com certa facilidade:

- Os oocistos de *C. cayetanensis* medem entre 8 e 10 µm, enquanto os de *C. parvum* não excedem 6 µm de diâmetro
- Apenas oocistos de *C. cayetanensis* emitem autofluorescência quando submetidos a feixe de luz ultravioleta
- Após esporulação em solução de dicromato de potássio a 2,5%, os oocistos de *C. cayetanensis* apresentam dois esporocistos, os quais apresentam dois esporozoítos no interior de cada um; já os oocistos de *C. parvum* são constituídos por quatro esporozoítos livres.

Além disso, anticorpos monoclonais anti-*Cyclospora* não reagem com *Cryptosporidium*.

Os oocistos de *Cyclospora* podem ser visualizados após uso de corantes álcool-acidorresistentes, podendo-se empregar o método de Kinyoun, a exemplo do que ocorre no caso de infecções por *Cryptosporidium*. Entretanto, os oocistos de *Cyclospora*, às vezes, coram-se de maneira irregular quando se

emprega essa técnica, dificultando sua identificação. Visvesvara *et al.*<sup>23</sup> verificaram, recentemente, que submetendo esfregaços fecais à técnica de Baxby *et al.*,<sup>5</sup> que utiliza safranina como corante, modificada por meio de aquecimento da preparação em forno de micro-ondas por 60 s, obtém-se coloração mais homogênea dos oocistos de *Cyclospora*. Recentemente, desenvolveram-se técnicas de biologia molecular para o diagnóstico da infecção humana por *C. cayetanensis*, os quais se mostraram mais sensíveis do que os métodos coprológicos.<sup>16</sup>

## ► Microsporídeos

São microrganismos pertencentes ao filo Microspora, conhecidos há mais de 150 anos como parasitos de grande gama de animais inferiores, que compreende de insetos a mamíferos. Constituem grupo composto por cerca de 100 gêneros e mais de 1.000 espécies diferentes. Recentemente, algumas espécies foram reconhecidas como parasitos de seres humanos que, na maioria das vezes, são indivíduos imunodeprimidos. Existem, entretanto, alguns relatos de infecção por microsporídeos envolvendo indivíduos aparentemente imunocompetentes.<sup>24</sup> Foram originariamente considerados protozoários; entretanto, surgiram evidências recentemente de que possam pertencer ao grupo dos fungos.<sup>8</sup> Como há dúvidas sobre sua classificação definitiva, neste texto figuram como protozoários.

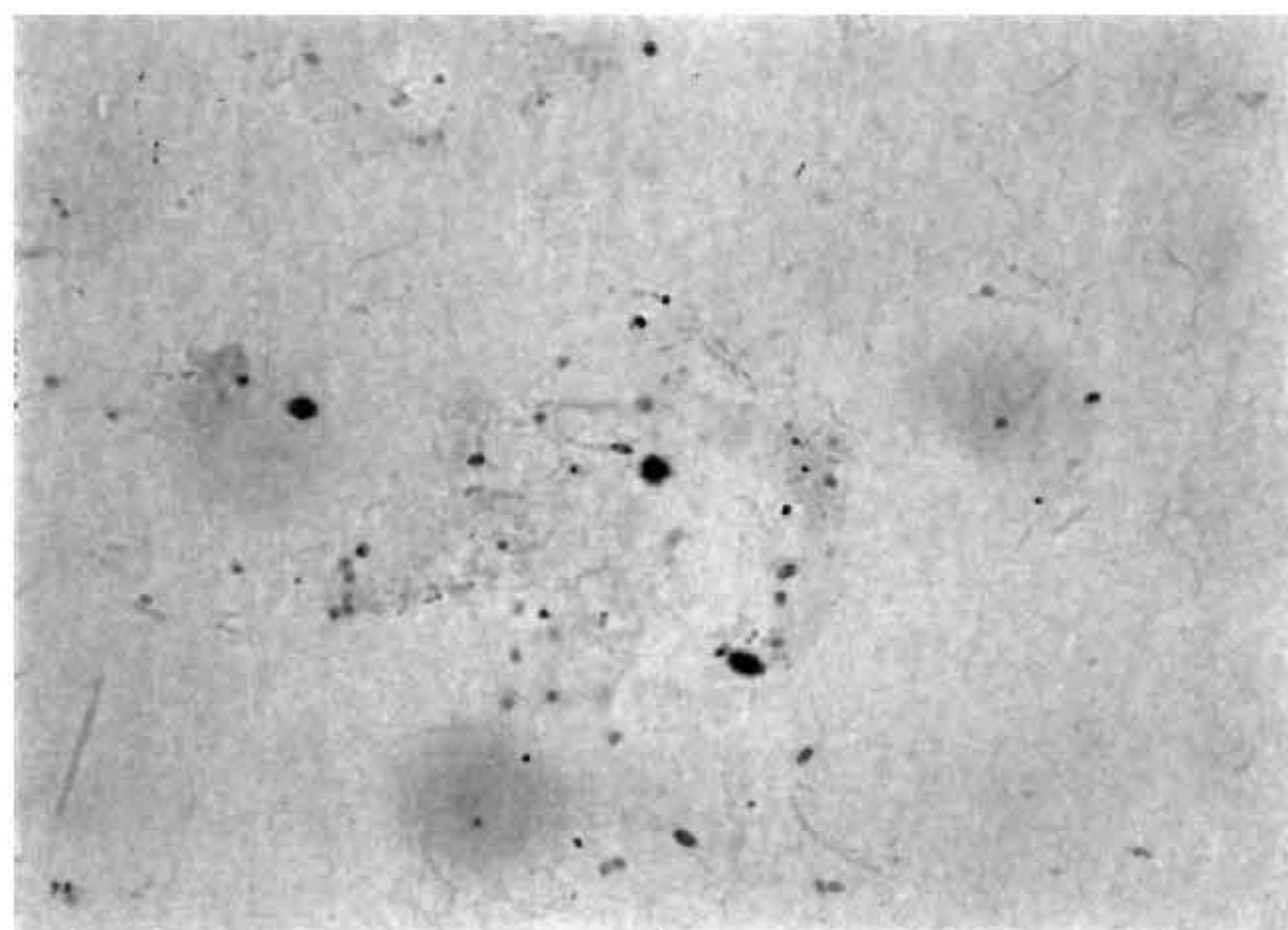
Microsporídeos são microrganismos intracelulares obrigatórios em todos os seus estágios evolutivos, com exceção dos esporos habitualmente eliminados pelas fezes e/ou outras dejeções dos indivíduos infectados.

A existência desses esporos, que conferem resistência às formas de transmissão dos microsporídeos, ao lado de outros detalhes morfológicos (como a ausência de mitocôndrias, peroxissomas e de membranas no aparelho de Golgi, além da presença do filamento polar – estrutura envolvida com o processo de infecção da célula hospedeira), atribui características especiais a esse grupo de microrganismos.<sup>25</sup>

Pelo menos 13 espécies de microsporídeos já foram encontradas infectando seres humanos, em sua maioria imunodeprimidos: *Anncalia algerae*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellen*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Nosema ocularum*, *Nosema conori*, *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Pleistophora ronneafiei*, *Microsporidium ceilonensis* e *Microsporidium africanum*.<sup>8</sup> Esses microrganismos podem causar desde infecções localizadas sem repercussões sistêmicas (p. ex., as queratoconjuntivites resultantes da infecção por *Nosema ocularum* ou *Vittaforma corneae*), até infecções sistêmicas com elevada morbidade (p. ex., as habitualmente determinadas por *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellen* ou *Encephalitozoon intestinalis*), passando por infecções que envolvem um ou dois sistemas anatômicos, como as resultantes da presença de *Enterocytozoon bieneusi*, *Trachipleistophora hominis* ou *Pleistophora ronneafiei*.

Inicialmente, o diagnóstico laboratorial de infecções por microsporídeos dependia do uso de microscopia eletrônica. O desenvolvimento de técnicas que permitem a identificação de esporos de microsporídeos por meio de exames que utilizam microscopia óptica ou outros meios veio, contudo, facilitar o diagnóstico genérico da infecção humana por esses microrganismos, embora o reconhecimento específico ainda necessite do emprego do microscópio eletrônico para confirmação.





**Figura 25.2** Esporos de microsporídeo, em esfregaço de fezes, corado pelo método de Weber *et al.*<sup>26</sup>

Com a microscopia de luz, esporos de microsporídeos podem ser demonstrados em diversos materiais biológicos, como fezes, urina, bile, lavado broncoalveolar ou escarro e líquido cefalorraquidiano. A identificação pode ser feita a partir de esfregaços corados com o método tricrômico, modificado por Weber *et al.*<sup>26</sup> ou com a associação entre esse método e a coloração de Gram.<sup>27</sup> No primeiro caso, os esporos de microsporídeos assumem coloração avermelhada (Figura 25.2); no segundo, um tom violeta, com boa diferenciação em relação a outras estruturas. Convém lembrar que, em virtude da dimensão reduzida dos esporos de microsporídeos que infectam seres humanos (1 a 3 µm de diâmetro), é necessário exame cuidadoso para sua identificação, embora esta seja facilitada pela coloração diferencial dos esporos em relação a bactérias, quando as técnicas propostas anteriormente são utilizadas.

Anticorpos poli ou monoclonais, produzidos por infecção experimental de camundongos, também se mostram úteis na identificação de esporos de microsporídeos, em materiais biológicos provenientes de pacientes com suspeita de infecção,<sup>27,28</sup> podendo ser utilizados, ainda, em amostras obtidas por biopsias.

Ultimamente, têm sido desenvolvidas técnicas de biologia molecular, com destaque para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico de infecções por microsporídeos, abrindo perspectivas promissoras face ao aumento de especificidade.<sup>8,30</sup>

Em inquéritos soropidemiológicos, diversas técnicas sorológicas têm sido empregadas para a pesquisa de anticorpos antimicrosporídeos. Todavia, devido a problemas com a especificidade e sensibilidade desses métodos, não recomendam seu uso para o diagnóstico laboratorial em nível individual.

## ► Referências bibliográficas

1. Larocco MT, Burgert SJ. Infection in the bone marrow transplant recipient and role of the Microbiology Laboratory in clinical transplantation. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 277-297.
2. Louria DB. Emerging and reemerging infections: the critical societal determinants, their investigation, and responsibilities. In: Scheld WM, Armstrong D, Hughes JM. (eds.) *Emerging Infections I*. Washington D.C., ASM Press, 1988; p. 247-259.
3. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 325-358.
4. Ma P, Soave R. Three-step examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis* 1983; 147: 824-828.
5. Baxby D, Blundell N, Hart CA. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J Hyg* 1984; 92: 317-319.
6. Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infection threat. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 51-57.
7. Mackenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME *et al.* A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994; 331: 161-167.
8. Stark D, Barrett JLN, Van Hal S *et al.* Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 634-650.
9. Fayer R. Taxonomy and specie delimitation in *Cryptosporidium*. *Epl Parasitol* 2010; 124: 90-97.
10. Goodgame RW, Genta RM, White AC *et al.* Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. *J Infect Dis* 1993; 167: 704-709.
11. Macpherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 198-202.
12. Tee GH, Moody AH, Cooke AH *et al.* Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol* 1993; 46: 555-558.
13. Rosenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stools specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1468-1471.
14. Ashford RW. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73: 497-500.
15. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH *et al.* *Cyclospora* species – a new protozoan pathogen of humans. *N Engl J Med* 1993; 328: 1308-1312.
16. Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 218-234.
17. García-López HL, Rodríguez-Tovar LE, Medina de La Garza CE. Identification of *Cyclospora* in poultry. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 356-357.
18. Yai LEO, Bauab AR, Hirschfeld MPM *et al.* The first two cases of *Cyclospora* in dogs, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39: 177-179.
19. Soave R, Johnson WD. Cyclospora: conquest of an emerging pathogen. *Lancet* 1995; 345: 667-668.
20. Coley DG. Widespread foodborne cyclosporiasis outbreaks present major challenges. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 354-356.
21. Guerrant RL, Thielman NM. Emerging enteric protozoa *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, and *Microsporidia*. In: Scheld WM, Armstrong D, Hughes JM (eds.). *Emerging Infections I*. Washington, D.C: ASM Press, 1998; p. 233-245.
22. Pieniazek NJ, Slemenda SB, Silva AJ *et al.* PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg Infect Dis* 1996; 4: 357-359.
23. Visvesvara GS, Moura H, Kovacs-Nace E *et al.* Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 730-753.
24. Orenstein JM. Intestinal microsporidiosis. *Adv Anat Pathol* 1996; 3: 46-58.
25. Müller M. What are the microsporidia? *Parasit Today* 1997; 13: 455-456.
26. Weber R, Bryan RT, Owen RL *et al.* Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 1992; 326: 161-166.
27. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F *et al.* A new and improved “quick-hot Gram-chromotrope” technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 888-893.
28. Aldras AM, Orenstein JM, Kotler DP *et al.* Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 608-612.
29. Javier Enriquez F, Dirlach O, Palting JD *et al.* Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 724-729.
30. Silva AJ, Bornay-Llinares F, Puente CA *et al.* Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) infections by polymerase chain reaction in stools samples using primers based on the region coding for small-subunit ribosomal RNA. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 874-879.



## Capítulo 26

---

# Toxoplasmose

*Mario Endsfieldz Camargo e  
Thelma Suely Okay*

- Aspectos epidemiológicos e parasitológicos, 305
- Aspectos clínicos, 305
- Diagnóstico laboratorial, 305
- Referências bibliográficas, 313



## ► Aspectos epidemiológicos e parasitológicos

Zoonose de felídeos causada pelo *Toxoplasma gondii*, a toxoplasmose é universalmente disseminada, infectando principalmente aves e mamíferos e, notadamente, o ser humano com níveis elevados de prevalência. Revelada por anticorpos séricos, essa prevalência é crescente com os grupos etários, atingindo valores distintos de acordo com a população estudada, variando de 30 a 90% em indivíduos adultos.

Foi observada, em moradores de uma comunidade na cidade de São Paulo, soroprevalência de 32,4% em crianças de 1 a 15 anos de idade,<sup>1</sup> enquanto em uma comunidade rural do estado do Amazonas a soroprevalência foi de 73%.<sup>2</sup> Estudo realizado em hospital público da Região Sul do Brasil no período de 1998 a 2005 demonstrou que a prevalência de toxoplasmose aguda em 41.112 gestantes foi de 4,8/1.000, enquanto a de toxoplasmose congênita foi de 0,9/1.000, estabelecida após acompanhamento das crianças por 11 meses.<sup>3</sup> Outro estudo brasileiro abrangendo a Região Metropolitana de São Paulo, realizado no período de 1984 a 2006, teve como objetivo estimar a soroprevalência da toxoplasmose na população, a idade de aquisição da infecção e a incidência anual de toxoplasmose congênita. A soroprevalência para a toxoplasmose foi de 64,9% entre mulheres em idade fértil, sendo a idade média de aquisição da doença de 10,74 anos, tendo a incidência de toxoplasmose congênita variado de 9,5 a 10,6 casos/1.000.<sup>4</sup>

O contágio pelo *Toxoplasma* se dá, predominantemente, pela ingestão de oocistos, os quais são eliminados pelas fezes de gatos ou de outros felídeos e podem permanecer viáveis no solo por muito tempo, resistindo a variações de temperatura e à dessecação, o que torna provável a infecção por inalação de poeira contaminada pelo parasito. Ocorre também pelo consumo de alimentos de origem animal, especialmente de carnes mal cozidas, contendo cistos (bradizoítas). Quando oocistos e cistos são digeridos no intestino delgado dos felídeos, liberam, respectivamente, esporozoítos e taquizoítos – estes últimos oriundos da transformação de bradizoítas que estavam dentro dos cistos. Os parasitos penetram nas células do hospedeiro e se reproduzem rapidamente, disseminando-se por via hematogênica, abrangendo variados órgãos e tecidos. A transmissão pode ocorrer, ainda, pelo transplante de órgãos de doador soropositivo para receptor soronegativo, no entanto, de maior importância clínica é a transmissão placentária e a consequente infecção fetal.<sup>5</sup>

## ► Aspectos clínicos

No indivíduo imunocompetente, a toxoplasmose geralmente assume caráter benigno, uma vez que o rápido desenvolvimento da imunidade humoral e celular restringe eficientemente a ação patogênica do parasito. Os toxoplasmas são segregados em microcistos, assumindo a forma cística de resistência que caracteriza a latência do processo e a forma crônica da infecção, que pode ser permanente por toda a vida. Desse modo, é comum que a fase aguda da infecção se mantenha em níveis subclínicos ou apenas com manifestações semelhantes às da mononucleose, de pouca expressão clínica, embora possam ocorrer formas graves com acometimento meningoencefálico, pulmonar, renal, hepático, cardíaco etc. A forma ocular da toxoplasmose, na fase crônica da infecção, está relacionada

com a presença das formas císticas na retina e com fenômenos de natureza imunológica.

No indivíduo imunodeficiente, porém, libertando-se da ação imunológica que o cerceia, o *Toxoplasma* invade órgãos e tecidos, nos quais se reproduz como taquizoíto, causando as formas graves da toxoplasmose, observadas na síndrome da imunodeficiência adquirida, nas imunossupressões medicamentosas que ocorrem nos transplantes – em especial nos de coração, fígado, rins e medula óssea –, nos tratamentos quimioterápicos de neoplasias, nas doenças debilitantes, incluindo a desnutrição e, ainda, nos pacientes imunologicamente imaturos, como o feto e o recém-nascido.<sup>6</sup>

## ► Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem base na pesquisa de anticorpos contra o parasito. Segundo as características imunoquímicas desses anticorpos, diferentes marcadores sorológicos têm sido descritos para distinguir entre infecção latente, comum na população, e infecção recente ou toxoplasmose doença. Outras respostas se esperam, também, da sorologia da toxoplasmose, como datar na gestante seu contágio pelo *Toxoplasma*, ou no imunodeficiente, detectar a reagudização de uma toxoplasmose latente. Devido a essas questões, a sorologia da toxoplasmose se apresenta como das mais complexas, em contínua evolução, exigindo uma variedade de testes que têm sido desenvolvidos com antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais dirigidos a regiões cada vez mais restritas e específicas do parasito, além de muito rigor e experiência para a interpretação de seus resultados. Entretanto, a evidênciação do parasito, por isolamento a partir de material do paciente, ou pela demonstração de seus componentes, como antígenos ou segmentos do DNA, é de alto valor diagnóstico, especialmente nos imunodeficientes, seja por imunodepressão, como nos pacientes com AIDS, por imunossupressão nos transplantados ou por imunoimaturidade no feto e no recém-nascido.<sup>7,8</sup>

### ■ Pesquisa do parasito ou de seus componentes

#### *Isolamento do Toxoplasma*

► **Inoculação em camundongo.** Sangue do paciente, de preferência a camada leucocitária ou sedimento do centrifugado de líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido amniótico, lavado broncoalveolar, suspensões de triturados de biopsia ou de placenta são inoculados por via intraperitoneal em camundongos. A positividade é indicada pela soroconversão do animal e confirmada pelo achado de taquizoítos no líquido peritoneal ou, mais frequentemente, de microcistos no cérebro e outros órgãos, o que, entretanto, pode exigir passagens às cegas a novos camundongos, inoculados com triturados de órgãos do primeiro animal. Os prazos longos para obtenção de resultados, de 30 dias ou mais, são compensados pela excelente especificidade do teste, muito embora a sensibilidade possa não atingir níveis adequados, na dependência da experiência do laboratório e dos profissionais que realizam os experimentos.<sup>8,9</sup>

► **Isolamento em cultura de células.** Os materiais suspeitos são semeados em culturas de células, como fibroblastos humanos, ou outras linhagens celulares. O desenvolvimento dos toxoplasmas no interior das células pode ser evidenciado com facilidade por imunofluorescência em prazos curtos, de até 1 semana. Porém, é procedimento menos sensível do que a inoculação em camundongo.<sup>8,9</sup>



### Pesquisa de antígenos

Material antigênico do *Toxoplasma* e complexos imunes formados de antígenos parasitários podem ser detectados no soro durante a fase aguda da toxoplasmose.<sup>10</sup> Porém, pela transitoriedade e inconstância da antigenemia, sua pesquisa é de pouco valor diagnóstico, limitação que poderia ser solucionada pela pesquisa de antígenos na urina, de que tem sido referida boa sensibilidade na neurotoxoplasmose.<sup>11,12</sup>

O parasito ou seus antígenos podem também ser evidenciados em cortes de tecidos, por imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpos específicos e coloração imunofluorescente ou imunoenzimática.

### Deteção de ácidos nucleicos | Reação em cadeia da polimerase

Ainda que presente em número extremamente reduzido, ou mesmo quando lisado, o *Toxoplasma* pode ser identificado pela detecção de segmentos característicos de seus ácidos nucleicos, depois de amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Dependendo do que se quer demonstrar, pode-se realizar a detecção de fragmentos de DNA do parasito ou a análise de expressão gênica quando a técnica utiliza amostras de RNA submetidas à transcrição reversa. Ainda dispendioso e exigindo a adoção de medidas rigorosas para evitar resultados falso-positivos, esse teste tem sido muito utilizado, podendo ser completado em até 24 h.<sup>13-19</sup> Entretanto, não existem até o momento kits comerciais de desempenho comprovado, tampouco consenso quanto aos procedimentos de extração dos ácidos nucleicos ou aos segmentos a serem amplificados, com resultados bastante heterogêneos entre laboratórios.<sup>20</sup> Assim, para identificação do *Toxoplasma*, podem ser amplificados vários segmentos de DNA oriundos de diferentes genes, como P30, AF146527 ou p529, DNA ribossomal, gene B1,<sup>13-19</sup> sendo este último o mais empregado.

Com o passar do tempo, a PCR convencional tem sido substituída por técnicas de detecção do parasito em amplificações realizadas em tempo real (*Real Time*-PCR, qPCR ou qRT-PCR) por permitirem a detecção e, ao mesmo tempo, a quantificação da parasitemia. Esses testes serão muito úteis para o acompanhamento do tratamento de pacientes com toxoplasmose. Ademais, a PCR em tempo real permite a eliminação da etapa de detecção do material amplificado, reduzindo a chance de resultados falso-positivos devido a *carry-over* de amostras positivas para negativas, bem como o risco relativo ao contato dos profissionais de laboratório com substância sabidamente cancerígena, o brometo de etídeo, sem falar no tempo gasto para a obtenção de resultados devido à realização da etapa de eletroforese para a visualização dos amplificados.<sup>21-24</sup>

Além da quantificação, a PCR em tempo real permite análise da expressão gênica por meio da amplificação de moléculas de cDNA produzidas a partir de RNA, após reação de transcrição reversa. Desse modo, comparando-se o nível de expressão de determinado gene em situação experimental em relação à expressão de genes constitutivos, tais como a beta-actina ou a betaglobina humana, pode-se quantificar a expressão do gene de interesse. Esse tipo de quantificação é conhecido como quantificação relativa.<sup>21-24</sup>

Após a amplificação de segmentos específicos de ácidos nucleicos do parasito, é possível analisar a participação de vários genes, ou a expressão de múltiplos genes de modo simultâneo em plataformas de *microarray*. No entanto, apesar de constituírem alternativas tecnológicas bastante atraentes, as plataformas de *microarray*, assim como a PCR em tempo

real, ainda apresentam custo proibitivo para uso em rotinas diagnósticas.<sup>25</sup>

Variantes da PCR têm sido empregadas para a caracterização de genótipos de *Toxoplasma gondii* que parecem estar associados a maior ou menor patogenicidade em infecções humanas. Foram descritos, inicialmente, três genótipos, sendo o tipo I associado às infecções mais graves e os tipos II e III às infecções humanas de menor gravidade; o tipo II é mais frequente em infecções congênitas nos EUA e na Europa.<sup>27-29</sup>

No modelo de toxoplasmose congênita, preconiza-se a realização do teste em líquido amniótico,<sup>15,17-19</sup> o qual pode ser, eventualmente, realizado em sangue de cordão fetal, em sangue colhido da placenta no momento do parto, em sangue de recém-nascidos – notadamente nos sintomáticos durante a primeira semana de vida –, em líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar, urina, e também em sangue materno.<sup>16,30-32</sup> Um resultado positivo em PCR convencional com detecção de DNA do parasito com finalidade diagnóstica, entretanto, não permite distinguir entre taquizoítos e formas císticas, isto é, entre infecção ativa e infecção latente, exigindo, portanto, criteriosa interpretação, notadamente nos pacientes imunodeficientes. Essa distinção pode ser realizada tanto em nível molecular quanto por intermédio da detecção de antígenos específicos de estágio parasitário, tendo em vista a existência de genes que apresentem expressão diferencial em determinada forma parasitária e não em outra, tais como o SAG1, que só é expresso em taquizoítos; BAG1, apenas em bradizoítas; e gene B1, em todas as formas parasitárias.<sup>13,22,33,34</sup>

### Testes sorológicos

Descrito por Sabin e Feldman,<sup>35</sup> o teste do corante deu lugar ao teste de imunofluorescência indireta (IFI),<sup>36</sup> que, além de mais prático e fornecer resultados comparáveis, permitiu a identificação de anticorpos IgG, IgM<sup>37</sup> e demais imunoglobulinas. No teste de imunofluorescência, assim como no teste do corante, os soros reagentes são titulados ensaiando-se diluições crescentes, incubadas sobre toxoplasmas fixados em lâminas de microscopia. Depois de lavadas, essas lâminas são novamente incubadas com conjugado fluorescente. Os resultados quantitativos são expressos pela maior diluição reagente ou no teste IFI-IgG, de preferência em Unidades Internacionais (UI/ml) com referência ao soro padrão da Organização Mundial da Saúde (OMS). Existe relação direta entre as duas formas de expressão; cada laboratório deve determinar o fator de conversão segundo suas condições de trabalho, dependentes das características do equipamento de microscopia e dos reagentes utilizados. Esse fator, UI/ml *versus* diluição, foi determinado por Niel *et al.*<sup>38</sup> como 0,15, valor também encontrado pelos autores.<sup>39</sup> A padronização com o soro de referência da OMS é indispensável para corrigir acentuadas diferenças entre resultados do teste de imunofluorescência, frequentemente observadas entre laboratórios. Não há disponibilidade de soros de referência para anticorpos IgM e IgA, e os resultados são dados em títulos correspondentes a diluições dos soros.

### Testes imunoenzimáticos

Em testes imunoenzimáticos (*enzyme-linked immunosorbent assay* [ELISA] ou *enzyme immuno assay* [EIA]), extratos ou frações antigênicas do *Toxoplasma* fixados sobre suportes inertes, como cavidades de placas ou microesferas, são incubados com diluições dos soros a testar e, em seguida, com conjugado enzimático antiglobulina (G, M, A ou E). Segue-se a incubação com produto capaz de, sob a ação da enzima,



desenvolver cor (ou fluorescência), cuja intensidade, lida em espectrofotômetro (ou fluorômetro), é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos antitoxoplasma no soro. Para o ELISA-IgG, o resultado é expresso em UI/mL, com relação ao *International standard for antitoxoplasma serum, human* (WHO International Laboratory for Biological Standards, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca). Para as demais imunoglobulinas, o resultado é fornecido em índices que correspondem ao quociente entre as densidades ópticas do soro em estudo e a de um soro de reatividade mínima, limiar entre reagente e não reagente. É preciso lembrar que nem sempre há perfeita coincidência entre resultados de testes imunoenzimáticos realizados em equipamentos de marcas diferentes, bem como com o teste de imunofluorescência, devido a diferenças entre os antígenos utilizados. Em termos gerais, existe correlação direta entre titulações por ELISA e por IFI, como também foi observado em resultados comparativos obtidos para o ensaio ELISA-IgG fluorométrico do sistema VIDAS bioMérieux em soros que no teste de imunofluorescência se mostraram reagentes com títulos de 1:16-1:64.000.<sup>40,41</sup>

### Teste de avides de anticorpos IgG

A afinidade ou avides com que os anticorpos IgG se ligam a seus respectivos antígenos pode ser avaliada pela maior ou menor facilidade de quebra dessa ligação. Mede-se por teste imunoenzimático ELISA-IgG modificado, pela dissociação dos complexos antígeno-anticorpo formados e liberação dos anticorpos IgG de baixa avides e por meio de solução caotrópica (p. ex., de ureia 6M [ELISA-ureia]). Para esse fim, após a incubação do soro na placa, esta é lavada com a solução de ureia e, em seguida, procede-se à reação pela incubação com o conjugado enzimático. Uma baixa avides é indicada por acentuada diminuição do título com relação ao título original obtido sem o tratamento pela ureia. O resultado é expresso pela porcentagem de IgG remanescente, dada pelo cálculo: (título após ureia/título original) × 100.

O teste de avides de anticorpos IgG tem sido utilizado para estimar a época em que a toxoplasmose foi adquirida pela gestante, e também quando não se dispõe de testes quantitativos de detecção de IgM e há suspeita da presença de IgM residual, não indicativa de infecção aguda ou recente. Nesses casos, é factível a utilização de anticorpos dirigidos contra antígenos de excreção/secreção de *T. gondii* em testes de avides de anticorpos IgG, com resultados bastante satisfatórios.<sup>42-45</sup>

### Detecção de anticorpos IgM

A pesquisa de anticorpos IgM pelas técnicas indiretas, com conjugados fluorescentes ou enzimáticos, está sujeita a resultados falso-positivos, pela interferência de fatores reumatóides (FR) frequentemente presentes no soro. O fator reumatóide é um anticorpo IgM contra IgG. Assim, durante o teste, quando anticorpos IgG antitoxoplasma presentes no soro fixam-se aos antígenos do parasito, o FR, por sua vez, fixa-se aos IgG e irá reagir com o conjugado anti-IgM. Um teste prévio para detecção do fator reumatóide nos soros não soluciona a maioria dos casos por ser positivo apenas em níveis muito elevados de FR encontrados na artrite reumatóide, para cujo diagnóstico o teste se destina. A remoção prévia das IgG dos soros por precipitação com um soro anti-IgG soluciona o problema. Esse procedimento evita o aparecimento de resultados falso-negativos que decorrem da competição dos anticorpos IgG, impedindo os IgM de se fixarem aos antígenos.

Para anticorpos IgM, ainda não se dispõe de um soro de referência, em unidades internacionais, como para os anticor-

pos IgG. Os títulos são dados como índices, quociente entre as densidades ópticas do soro em análise e de um soro de reatividade limiar, correspondente ao *cut-off* do teste.<sup>46,47</sup>

► **Testes de captura de anticorpos IgM.** Outra possibilidade para eliminar os resultados falsos por interferência de fatores reumatóides são os testes de captura de anticorpos IgM.<sup>46</sup> Incubam-se os soros em cavidades de placas recobertas por anticorpo anti-IgM. Após etapas de lavagem, segue-se nova incubação com antígeno do *Toxoplasma* marcado por enzima, que irá se fixar ali na eventualidade de existir, em meio às IgM, aquelas específicas para o *Toxoplasma*. Nos testes positivos, obtém-se desenvolvimento de cor. É preciso assinalar, entretanto, que, de grande sensibilidade, esses testes podem detectar níveis diminutos de anticorpos IgM, eventualmente presentes por longos períodos após a fase aguda da toxoplasmose, e mesmo anticorpos IgM “naturais” em pacientes não infectados pelo *Toxoplasma*. Por esses motivos, existe tendência atual de se interpretar a detecção de IgM ao menos de modo semiquantitativo. A captura de anticorpos IgM antitoxoplasma pode ser evidenciada pela aglutinação de suspensão de toxoplasmas, incubada após o soro nas cavidades da placa, revestida por anticorpos anti-IgM. É o teste ISAGA (*immunosorbent agglutination assay*).<sup>47</sup> A intensidade da aglutinação, observada com diferentes concentrações de toxoplasmas, permite uma avaliação quantitativa, exprimindo-se os resultados em índices correspondentes aos graus de aglutinação resultantes. Esse teste tem sido utilizado também para a evidênciação de anticorpos IgA e de anticorpos IgE.

### Testes de hemaglutinação

Como descrito originalmente por Jacobs e Lunde em 1957,<sup>48</sup> com hemácias de carneiro recobertas por componentes do parasito, principalmente citoplasmáticos, o teste de hemaglutinação (HA) apresentava baixa sensibilidade,<sup>2</sup> não detectando anticorpos IgM nem anticorpos IgG de baixa avides, além de sofrer a interferência de anticorpos heterófilos, podendo, por essa razão, produzir resultados falso-positivos. Tais falhas foram solucionadas ao se utilizarem hemácias de aves recobertas com antígenos completos do parasito, aglutináveis por anticorpos tanto IgG como IgM, tornando o teste extremamente sensível.<sup>49,50</sup> Às diluições do soro, em cavidades de microplacas, adicionam-se as hemácias, que, após cerca de 1 h, mostram-se aglutinadas para os soros reagentes. Os títulos são expressos pela maior diluição reagente. Para se detectar anticorpos IgM, repete-se o teste com os soros previamente diluídos em solução de 2-mercaptoetanol, que inativa os anticorpos IgM. Assim, uma significativa redução do título indica a presença destes. Após a remoção de IgG das amostras, por precipitação com anti-IgG, o teste de hemaglutinação apresenta maior sensibilidade para anticorpos IgM, podendo detectá-los mesmo em soros com altos títulos de anticorpos IgG, nos quais, sem essa remoção, poderia não ser relevante o diferencial de títulos após o tratamento com 2-mercaptoetanol. Ocasionalmente, observam-se resultados falso-positivos no teste de hemaglutinação, por interferência de anticorpos IgM “naturais”, aglutininas IgM não específicas, em geral de títulos baixos. Distinguem-se de reações específicas por permanecerem com títulos inalterados, enquanto aquelas se elevam em poucos dias na fase aguda da toxoplasmose.

Muito embora os testes de hemaglutinação tenham sido abandonados em grandes centros que utilizam como triagem preferencialmente os ensaios imunoenzimáticos ou imunofluorimétricos devido à possibilidade de análise de grande número de amostras por métodos automatizados, outra característica



interessante do teste de hemaglutinação é que anticorpos IgG de baixa avides, como ocorre no início da infecção, têm pouco poder aglutinante, do que resultam títulos baixos, embora sejam elevados nos testes de imunofluorescência ou ELISA, em que a avides não interfere. Essa discrepância de títulos entre reações constitui um bom marcador de infecção recente.

Inicialmente, procede-se ao teste com soro diluído a 1:16 e, se reagente, procede-se à titulação dos anticorpos pelo ensaio de diluições crescentes do soro, paralelamente em solução salina e em solução de 2-mercaptoetanol. O título corresponderá à maior diluição reagente na série em solução salina. Título idêntico na série com 2-mercaptoetanol, ou apenas uma diluição abaixo, não revela a presença de anticorpos IgM em nível significativo, os quais são indicados por diferenças de duas diluições ou mais. Como para os demais testes para anticorpos IgM, títulos ou valores baixos (de até 256, raramente 512) no teste de hemaglutinação podem ser inespecíficos devido a anticorpos naturais. Distinguem-se dos IgM específicos, de fase aguda inicial, por não apresentarem elevação evidente em nova amostra de soro colhida poucos dias depois. No teste de hemaglutinação, alguns detalhes técnicos devem ser obedecidos, como agitar a placa ou submetê-la à vibração por pelo menos um minuto após a adição do reagente, mantê-la, em seguida, em repouso, livre de trepidações e em temperatura acima de 20°C (preferencialmente a 37°C), até a leitura dos resultados.

### Deteção de anticorpos IgA e IgE

Para a pesquisa de anticorpos IgA<sup>51,52</sup> e IgE<sup>53</sup> são mais utilizadas as técnicas imunoenzimáticas, tanto a indireta como a de captura. Embora essas reações estejam sujeitas a alguma discrepância de resultados, pois ainda não se encontram suficientemente padronizadas, os anticorpos IgA e IgE parecem constituir importantes marcadores de infecções recentes, inclusive congênicas, por serem produzidos por períodos mais limitados em relação a IgM, principalmente a IgG.

### Outros testes

Para a detecção de anticorpos antitoxoplasma são descritos testes de *aglutinação direta*, com suspensões de toxoplasmas fixados por formaldeído ou por acetona.<sup>54</sup> A aglutinação dos taquizoítos fixados por acetona é característica das infecções recentes, sendo utilizada para distingui-las de infecções latentes. Para o teste de *aglutinação do látex* são utilizadas partículas recobertas por antígenos do parasito, sendo seu uso bastante restrito.

A reatividade de anticorpos para diferentes componentes antigênicos do *Toxoplasma* pode ser evidenciada pelos testes de *immunoblot*.<sup>55,56</sup> Tiras de nitrocelulose com esses componentes, distribuídos como bandas de pesos moleculares crescentes, são incubadas com os soros ou outros líquidos orgânicos (líquido cefalorraquidiano, humor aquoso) e a reação revelada por um conjugado imunoenzimático (anti-IgG, IgM, IgA). Originam-se perfis de reatividade, que têm sido utilizados com fins diagnósticos, inclusive pela elevada sensibilidade, que permitem evidenciar reações contra bandas específicas, por vezes insuficientes, para originar um sinal detectável em testes como ELISA. No entanto, é preciso ter em mente a possibilidade de ocasionais resultados inespecíficos devido a “anticorpos naturais” reagindo com antígenos do *Toxoplasma*.

### ■ Pesquisa de imunidade mediada por células

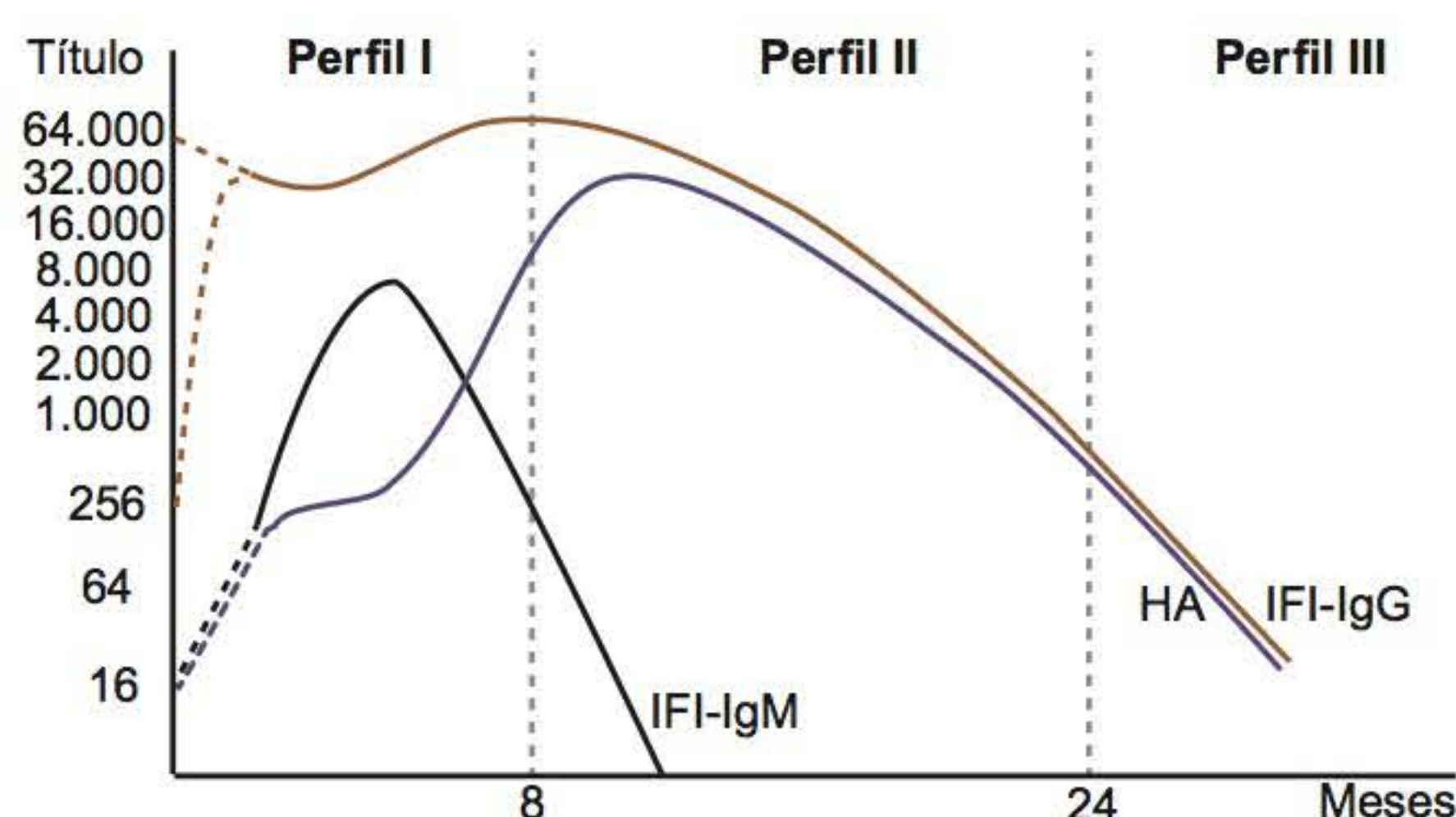
Embora a proteção contra a toxoplasmose seja mediada primariamente por defesas celulares, em que os linfócitos T são cruciais, a investigação da imunidade celular não tem sido

explorada para fins diagnósticos. A reação intradérmica à toxoplasmina,<sup>57</sup> extrato de toxoplasmas colhidos da cavidade peritoneal de camundongos experimentalmente infectados, de tipo tuberculínico, mostra-se positiva na fase crônica da infecção. Seu uso não se difundiu, em vista do maior desenvolvimento do diagnóstico sorológico, pela falta de padronização do antígeno e pelo risco de transmissão de agente infeccioso, ocasionalmente presente no camundongo. A quantificação *in vitro* da resposta imune celular a antígenos, pela proliferação celular medida pela incorporação de timidina triciada após cultura dos linfócitos em presença de extratos do parasito, apresentou blastogênese somente cerca de 3 meses após a fase aguda da toxoplasmose.<sup>58</sup> Atualmente, a simplificação da técnica, detectando por citometria de fluxo a expressão, na superfície dos linfócitos, de receptores índices de ativação celular, como CD25, CD71, CD69, facilita grandemente a investigação da imunidade celular,<sup>59</sup> o que poderá vir a ser um precioso auxílio diagnóstico nos casos suspeitos de toxoplasmose congênita.

Mais recentemente, foi descrita uma família de receptores transmembrana chamados *toll-like* (TLR), contando com mais de uma dezena de representantes. Trata-se de moléculas bem conservadas que reconhecem padrões moleculares específicos associados a microrganismos, induzindo diferentes tipos de resposta imune. As vias de sinalização dos TLR têm início com a ativação da molécula adaptadora comum, o fator de diferenciação mieloide 88 (MYD88), que leva à ativação do fator de transcrição NFκB e de mitógenos, que são membros da família das proteinoquinase, promovendo a amplificação do sinal iniciado pelo reconhecimento dos padrões específicos do parasito pelos TLR. O estudo dos TLR e das vias de sinalização nas quais estão envolvidos auxiliará a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que promovem a modulação da resposta imune dos indivíduos com toxoplasmose.<sup>60,61</sup>

### ■ Perfis e marcadores sorológicos

O aparecimento de anticorpos dirigidos contra o *Toxoplasma*, assinalado pela soroconversão dos testes sorológicos de negativos para positivos, traduz a resposta humoral à infecção recém-adquirida. As curvas de ascensão e queda de títulos dos diferentes anticorpos obedecem a ritmos diversos (Figura 26.1), o que caracteriza três perfis sorológicos sucessivos na evolução da toxoplasmose.<sup>62</sup> Assim, ainda na vigência da parasitemia, observada nas primeiras semanas da primoinfecção, surgem anticorpos específicos representados por isótipos IgM, IgA, IgE e, principalmente, IgG.



**Figura 26.1** Perfis sorológicos, segundo o comportamento de anticorpos anti-*Toxoplasma*, detectados pelos testes de IFI-IgG, IFI-IgM e HA, no curso da infecção pelo *Toxoplasma gondii*.



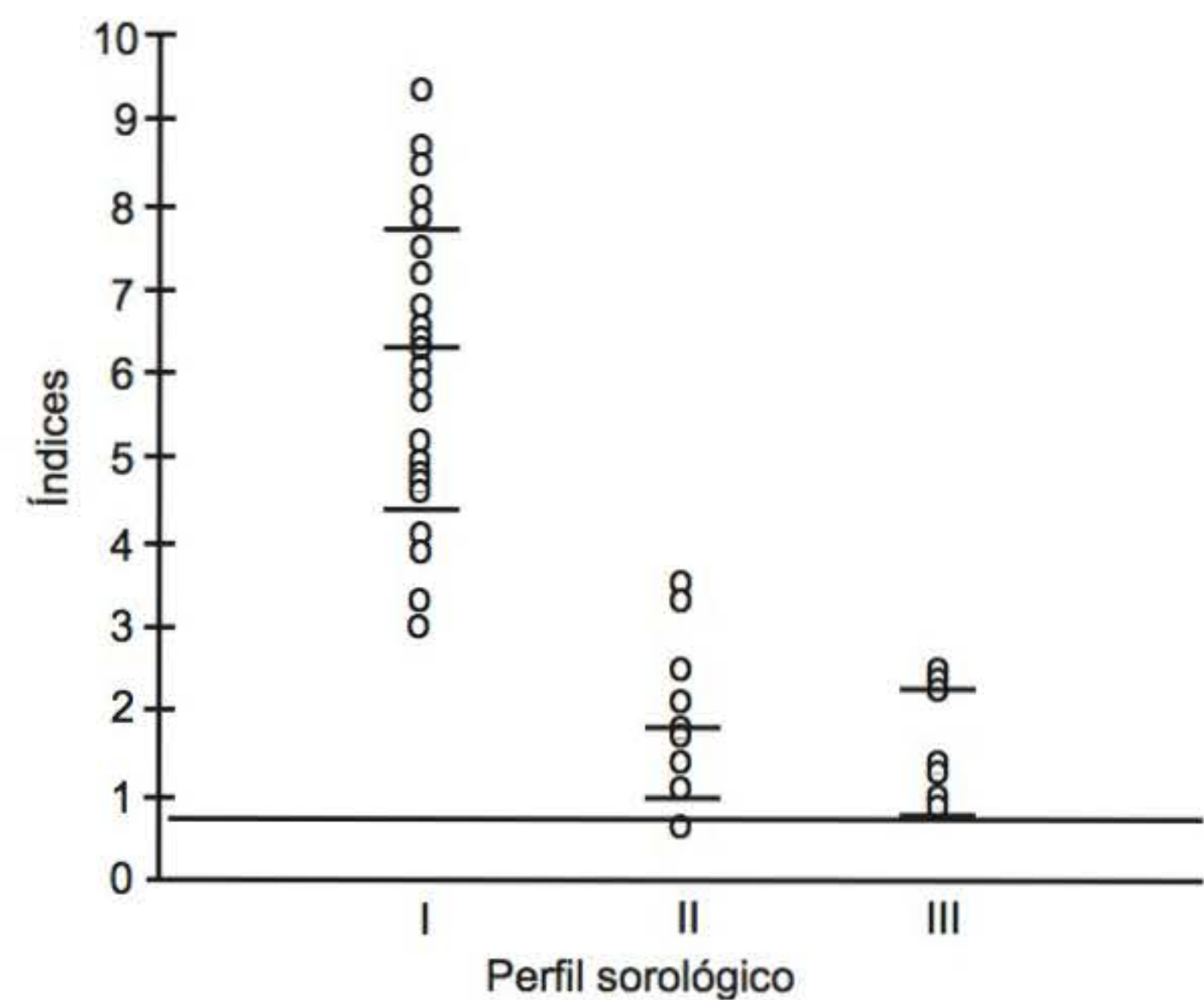
Caracteriza-se, desse modo, um perfil sorológico de toxoplasmose recente, no qual esses diversos anticorpos estão presentes e se constata, inclusive, que os anticorpos IgG são de baixa afinidade ou avides, detectada pelo ELISA-ureia anteriormente descrito, ou pelo diferencial entre títulos significativamente mais altos nos testes de imunofluorescência ou ELISA em relação aos resultados da hemaglutinação (Quadro 26.1).

A seguir, na evolução da infecção, configura-se um perfil sorológico de transição, com níveis elevados de anticorpos IgG, de avides crescente, mostrando títulos hemaglutinantes, com tendência a se igualar aos dos testes com anticorpos marcados. Estão ausentes os anticorpos IgA e IgE, assim como os anticorpos IgM, estes ocasionalmente presentes em baixos títulos. Progressivamente, esse quadro sorológico dá lugar ao perfil de infecção latente ou crônica, que, em geral, mantém-se por toda a vida com anticorpos IgG de baixos títulos e de alta avides, ausentes os anticorpos de outros isótipos, ainda que, ocasionalmente, encontrem-se resíduos de anticorpos IgM. A transição do perfil sorológico de infecção recente para o perfil de infecção latente é mais ou menos lenta, em semanas ou meses, dependendo do estado imunitário dos pacientes (Figura 26.1).

É preciso ter sempre em mente que a detecção de anticorpos IgM não significa, forçosamente, infecção ativa, mas são apenas marca de contágio, em geral, recente. Entretanto, não têm valor absoluto, pois, com certa frequência, podem ser encontrados no soro até por muitos meses. Isso é tanto mais verdade quanto maior a sensibilidade dos testes utilizados. Porém, nessa eventualidade, os níveis de IgM são significativamente mais baixos do que nas fases recente ou de transição. Assim, em 60 soros reagentes no teste fluorométrico de captura VIDAS-Toxo-IgM estudados, todos os 31 soros de infecção recente apresentaram índices de IgM superiores a 3,0, e destes, em 29 dos casos acima de 3,5. Dos 20 casos de toxoplasmose na fase de transição, somente sete mostraram índices entre 3,0 e 3,5, enquanto para os de toxoplasmose latente ainda com IgM, seus índices foram inferiores a 3,0 (Figura 26.2). Evidentemente, na fase aguda, podem ser encontrados valores baixos, mas geralmente em rápida ascensão.

### Diagnóstico de toxoplasmose em gestantes

No indivíduo imunocompetente, o diagnóstico da infecção pelo *Toxoplasma* é, basicamente, sorológico. A primoinfecção é indicada pela soroconversão e perfil sorológico de infecção recente, presentes ou não nas manifestações clínicas de fase aguda da toxoplasmose. Sua detecção sorológica tem valor para o diagnóstico do paciente enfermo, mas assume grande importância na gestante, na prevenção da toxoplasmose congênita. Atualmente, a gestante é considerada imunotolerante, ou até mesmo imunossuprimida, por alguns autores. É preciso



**Figura 26.2** Níveis de anticorpos IgM (teste VIDAS-Toxo-IgM) de 60 soros de diferentes perfis sorológicos: I – toxoplasmose recente; II – toxoplasmose em fase de transição; III – toxoplasmose crônica ou latente.

insistir que, na maior parte dos casos, somente há transmissão fetal da toxoplasmose quando a primoinfecção ocorre na vigência de gestação. Em cerca de 80% dos casos, a infecção é oligo ou assintomática, o que não diminui sua gravidade para o feto, notadamente naqueles que forem infectados no primeiro trimestre da gestação.

Excepcionalmente, pode haver transmissão fetal quando a infecção materna é adquirida poucas semanas ou até alguns meses antes da concepção.<sup>63-65</sup> Embora as possibilidades de transmissão fetal sejam remotas, é recomendado que a mulher não engravide dentro de 6 a 9 meses após toxoplasmose aguda ou após soroconversão,<sup>66</sup> considerando-se que, por pelo menos 3 meses após a positividade dos testes sorológicos<sup>48</sup> possa existir parasitemia. Na gestante com perfil sorológico de infecção latente, o reaparecimento de um perfil de toxoplasmose aguda, sugestivo de reinfecção, pode resultar em transmissão da toxoplasmose para o feto e consequente quadro de toxoplasmose congênita,<sup>67</sup> muito embora essa situação seja mais rara em relação à ocorrência de primoinfecção durante a gestação.

Não obstante, é frequente a transmissão vertical da toxoplasmose por gestantes imunodeficientes apresentando perfil sorológico de toxoplasmose crônica, como tem ocorrido na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou em outras doenças imunodepressoras, bem como na vigência ou mesmo após o uso de terapêuticas imunossupressoras, como observado em casos de linfoma de Hodgkin e em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, por vezes, anos após a interrupção da utilização de corticosteroides.<sup>67</sup>

O relato de bons resultados terapêuticos na prevenção e na redução da gravidade da toxoplasmose congênita<sup>68-70</sup> torna obrigatória a triagem de gestantes de risco, soronegativas, assim como o acompanhamento daquelas com perfil de toxoplasmose recente, ou que se identifiquem com os quadros anteriormente descritos.

### Testes para triagem e seguimento de gestantes de risco

Pelo grande contingente de gestantes desprovidas de anticorpos para o *Toxoplasma*, não raro de 50 a 60% – dependendo de condições socioeconômicas, hábitos alimentares e contato com animais –, a repetição dos testes a cada 4 ou 5 semanas

#### Quadro 26.1 • Características laboratoriais da toxoplasmose recém-adquirida.

Parasitemia	Detectada pelo isolamento no sangue do <i>Toxoplasma</i> , pela inoculação no camundongo ou por cultivo em cultura de células, ou por identificação de ácidos nucleicos (PCR)
Marcadores sorológicos	Anticorpos IgM, IgA e IgE Anticorpos IgG em rápida ascensão ou de título elevado Anticorpos IgG de baixa avides (detectada pelo teste ELISA após tratamento dos complexos imunes por soluções dissociantes, ou por significativo diferencial de títulos altos no teste de imunofluorescência e baixos no teste de hemaglutinação)



naquelas que permanecem soronegativas é mandatória. São necessários testes sensíveis para essa triagem, porém de baixo custo e de execução simples, capazes de detectar anticorpos IgG e IgM e que possam fornecer resultados a curto prazo. Atualmente, dispõe-se de vários sistemas automatizados, como VIDAS (bioMérieux), AXSYM (Abbott) e outros para anticorpos IgG e IgM, o que torna simples e rápida a realização dos testes, possibilitando a análise de grande quantidade de amostras, limitados apenas pelo custo. Anteriormente considerado inadequado para a triagem de gestantes de risco, pela baixa sensibilidade na fase aguda da toxoplasmose, o teste de hemaglutinação, quando realizado com reagentes desenvolvidos mais recentemente, mostra-se muito prático e adequado.<sup>49</sup> De sensibilidade elevada, é capaz de detectar desde 5 UI/ml de anticorpos IgG e de assinalar a presença de anticorpos IgM. A Figura 26.3 indica um algoritmo para a utilização do teste de hemaglutinação na triagem de gestantes.

Entretanto, problema frequente para o obstetra é a mulher, já no curso de uma gravidez, que apresenta sorologia positiva para a toxoplasmose, sem histórico de testes no passado que assegurem uma soroconversão anterior à gestação atual. Impõe-se, então, a avaliação do risco de transmissão ao feto, levando-se em conta o atual perfil sorológico e o tempo de gestação, que permitam inferir a data provável do contágio.

Diante de um perfil de toxoplasmose recente, a determinação presumível da época da primoinfecção – se ocorreu na gestação atual ou em época anterior – assume importância prognóstica para a possibilidade de infecção fetal. Para esse fim, as pesquisas de anticorpos IgA e IgE podem trazer subsídios, por apresentarem-se no soro geralmente por períodos mais curtos do que os anticorpos IgM, que são encontrados durante prazos que variam de poucas semanas a meses e, eventualmente, até por anos devido à maior sensibilidade dos kits diagnósticos atuais. Os anticorpos IgA, detectáveis em cerca de 80% dos casos, permanecem por 3 a 6 meses, prazo que pode variar até de 1 a 18 meses<sup>52</sup> e os anticorpos IgE por cerca de 4 meses, mas que podem se estender por até 8 meses.<sup>53</sup>

A interpretação do risco, em presença de perfil sorológico de transição, é também delicada. Observado ainda no primeiro trimestre, esse perfil é muito sugestivo de soroconversão anterior à concepção. Entretanto, é indicação para que se proceda à pesquisa da infecção fetal, como para o perfil de fase aguda.

Um perfil de toxoplasmose pregressa ou latente, como definido anteriormente praticamente exclui a possibilidade de soroconversão na gestação em curso, mormente quando detectado nos dois primeiros trimestres. Nos numerosos casos de toxoplasmose congênita que foram acompanhados, as parturientes sempre apresentavam perfis de fase aguda ou de transição para a fase crônica. Entretanto, a presença de anticorpos IgM residuais em gestantes na fase de toxoplasmose latente, detectáveis especialmente pelos testes de maior sensibilidade, têm criado problemas de um falso diagnóstico de risco quando sem qualquer significado como marcadores de infecção recente. Nesse caso, estão ausentes os demais marcadores, como anticorpos IgA e IgE e, principalmente, os anticorpos IgG são de alta avidéz.

É preciso sempre ter em mente que um teste sorológico tem limitações por se tratar de técnica indireta de diagnóstico, dependente da resposta humoral do paciente, bem como da possibilidade de resultados falso-positivos e negativos.

### Diagnóstico de toxoplasmose no imunodeficiente

Na toxoplasmose em pacientes imunodeficientes, inclusive nos imunoimaturados, tais como fetos e recém-nascidos, o quadro sorológico, ainda que possa fornecer informações úteis, é de valor diagnóstico reduzido. Assume, então, papel relevante a detecção do parasito ou de seus componentes.

### Diagnóstico de toxoplasmose no feto

Os toxoplasmas atingem o feto por intermédio da parasitemia materna, que causa infecção da placenta, o que favorece a passagem transplacentária dos parasitos no terceiro trimestre da gestação devido à maior permeabilidade da placenta.<sup>66</sup> Por isso, enquanto diminuta a probabilidade de contaminação fetal no início da gestação, de 1 a 2% no primeiro mês e cerca de 10% no primeiro trimestre, alcança valores de 70 a 90% no terceiro trimestre, com a média global de 30 a 40%, geralmente das gestantes que apresentam soroconversão.<sup>4</sup> Ao mesmo tempo, as lesões fetais são tanto mais graves quanto mais precocemente o feto é atingido. Com a instituição precoce de terapêutica antiparasitária, refere-se um sensível decréscimo dessas porcentagens, assim como da gravidade das lesões, muito embora alguns autores discordem desses dados.<sup>71-73</sup> Constatada a soroconversão ou diante de um perfil sorológico de infecção recente, é recomendada a adminis-

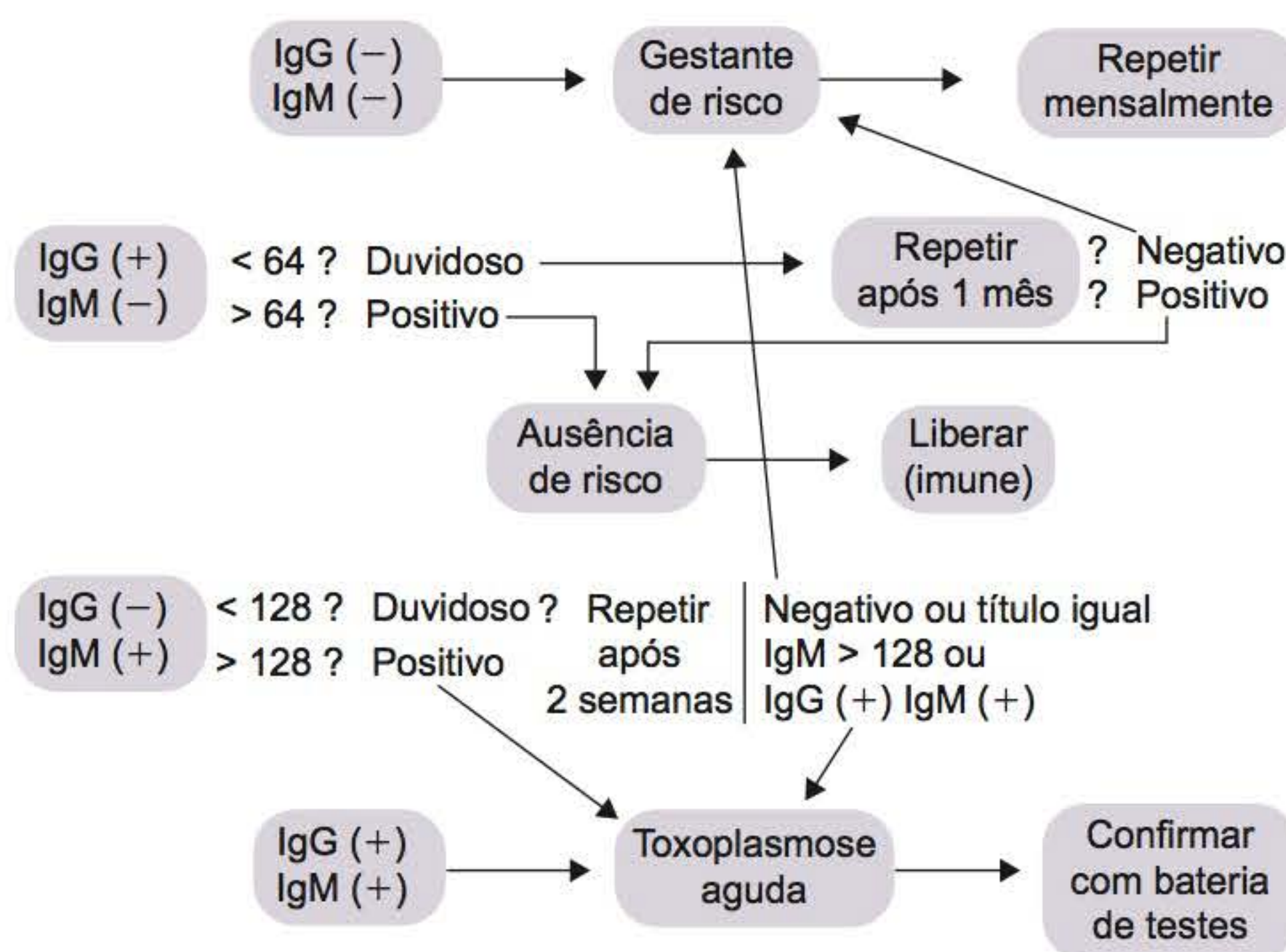


Figura 26.3 Toxoplasmose. Triagem de gestantes – teste de hemaglutinação.



tração de terapêutica antiparasitária até o fim da gestação, na expectativa de se impedir a fixação do *Toxoplasma* na placenta. Tem sido dada preferência a fármacos de menor risco iatrogênico, como a espiramicina, ficando restrita medicação mais ativa, mas de maior risco e toxicidade, como a associação de pirimetamina e sulfadiazina, para quando cabalmente demonstrada presença de infecção fetal, após a 18ª semana de gestação. A evidenciação do *Toxoplasma* no líquido amniótico é realizada a partir da 14ª semana, alguns centros preferindo aguardar até a 16ª ou até mesmo a 18ª semana, de preferência pela reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>13-19</sup> com elevada sensibilidade, de até 90%, e especificidade geralmente de 100%. Sendo assim, o temor inicial de que a reação em cadeia da polimerase pudesse gerar contingente significativo de resultados falso-positivos se revelou infundado, e os vários estudos realizados empregando genes-alvo distintos revelaram grande heterogeneidade de resultados, sugerindo não apenas que os protocolos de amplificação sejam muito díspares, mas também que possam existir sistemas mais adequados para determinadas populações devido a características genéticas dos indivíduos.<sup>19</sup> Também utilizando a PCR após a 20ª ou 22ª semana de gestação, o *Toxoplasma* pode ser demonstrado em sangue fetal obtido por cordocentese, em que ainda é possível pesquisar anticorpos dirigidos contra o parasito. A pesquisa de anticorpos IgG no sangue de cordão não tem valor diagnóstico pela presença de anticorpos maternos de transferência passiva, enquanto a pesquisa de anticorpos IgM reveladores de infecção fetal, embora de alta especificidade, é de sensibilidade reduzida pois que se positiva em apenas 20 a 30% dos casos. Essa porcentagem tende a aumentar com o amadurecimento imunológico do feto, podendo chegar em recém-nascidos a 50% ou mais.<sup>46,47</sup> A pesquisa de anticorpos IgA no sangue de cordão tem sido sugerida como mais sensível, de 70 a 90%.<sup>52</sup> No sangue fetal podem ser encontrados indícios indiretos da infecção, como eosinofilia, plaquetopenia, e níveis elevados de IgM total e de enzimas tais como a gamaglutamil transferase e a desidrogenase láctica.<sup>74</sup>

O *Toxoplasma* pode ser evidenciado mais precocemente pela biopsia de vilosidades coriais, no entanto, a reduzida probabilidade de infecção fetal nos períodos iniciais da gestação e os maiores riscos desse procedimento não a tornam, em geral, recomendável.

### Diagnóstico de toxoplasmose no recém-nascido

O recém-nascido infectado pelo *Toxoplasma* em geral apresenta parasitemia, que pode ser detectada na camada leucocitária de sangue periférico, em geral durante todo o primeiro mês de vida, mas principalmente na primeira semana de vida, quando apresenta sensibilidade de até 90%, especialmente pela PCR.<sup>5,6</sup>

De alta sensibilidade diagnóstica são as alterações anatomopatológicas observadas na placentite por *Toxoplasma*<sup>75</sup> e a identificação do *Toxoplasma* na placenta, por inoculação no camundongo ou em cultura de células e, com maior sensibilidade, por PCR. Ocasionalmente a infecção pode ficar restrita à placenta, não atingindo o feto.

No recém-nascido, a resposta humoral pode auxiliar o diagnóstico, sendo muito importante, para esse fim, o exame tanto do soro da criança como da mãe. Na presença de sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose, altos títulos de anticorpos IgG no recém-nascido aliados a um perfil materno de infecção recente têm alto valor preditivo positivo de toxoplasmose congênita, mas que deverá ser comprovado pela positividade na criança, de teste para anticorpos IgM ou pela evidenciação

do *Toxoplasma*. Outra comprovação, de alta sensibilidade, são perfis diferentes de anticorpos IgG maternos e do recém-nascido no teste de *immunoblot* com antígenos do *Toxoplasma*.<sup>55,56</sup> Estes, distribuídos em bandas de pesos moleculares crescentes, são incubados com os soros e, após revelação, identificam-se as bandas com que os anticorpos reagiram. O soro do recém-nascido não infectado irá originar perfil semelhante ao materno, enquanto o soro diferente será o infectado, produzindo seus próprios anticorpos, cuja reatividade característica soma-se à da mãe.<sup>55,56</sup> Anticorpos IgM no soro da criança são diagnósticos de infecção congênita, exceto nos primeiros 10 dias de vida quando, presentes no soro materno, podem ter contaminado o sangue do recém-nascido. Nesse caso, sua duração é curta, pois a meia-vida de IgM é de 5 dias. A pesquisa de anticorpos IgM é de baixa sensibilidade no teste clássico de imunofluorescência, de apenas 20 a 30%, e ainda com alto risco de resultados falso-positivos. Estes são removidos pela precipitação prévia de IgG da amostra, o que também eleva a sensibilidade do teste para cerca de 50%. Mais sensíveis e específicos são os testes de captura de IgM, especialmente os ensaios fluorométricos, como o teste VIDAS-IgM, que atingem sensibilidade de 80 a 90%, e maior ainda no teste de *immunoblot*.<sup>55,56</sup>

Como já referido, nem todo recém-nascido infectado tem capacidade de produzir anticorpos e, nos casos suspeitos, porém negativos, a pesquisa de anticorpos IgM deve ser repetida 1 a 2 meses após o nascimento.

A pesquisa de anticorpos IgA tem sido recomendada para diagnóstico da infecção neonatal,<sup>52</sup> como tão ou mais sensível do que a de anticorpos IgM. Com grande frequência são positivos os testes para IgG antitoxoplasma no líquido cefalorraquidiano do recém-nascido com toxoplasmose congênita, mesmo assintomático, não raro também para anticorpos IgM.

Nos não infectados, os títulos de anticorpos IgG caem progressivamente, até a negatificação, em prazos de poucos meses a 1 ano; mas nos infectados esses títulos são permanentes ou ascendentes. Porém, devido à imaturidade imunológica da criança com toxoplasmose, ela não produz anticorpos, os títulos caem, por vezes até a negatificação por esgotamento dos anticorpos de transferência passiva, para se elevarem, em seguida, à medida do despertar da resposta humoral.<sup>5,6</sup> Esse fenômeno é conhecido como *serological rebound*.<sup>71</sup> A pesquisa de imunidade celular específica para o *Toxoplasma* tem sido investigada para fins diagnósticos, especialmente da infecção congênita, cujo desenvolvimento ocorre no primeiro ano de vida. Após o 3º mês, apresenta grande sensibilidade,<sup>58</sup> devendo ser melhor investigada nos 2 primeiros meses. Como referido, a citometria de fluxo para detecção da expressão de receptores indicativos de ativação na superfície de linfócitos facilita grandemente a pesquisa da imunidade celular.<sup>59</sup>

Não se deve esquecer que, em cerca de 80% dos casos, a toxoplasmose congênita é inaparente, assim como foi, frequentemente, a infecção materna, passando despercebida, mas que será causa de lesões posteriores, principalmente oculares e cerebrais, levando a cegueira e a distúrbios neurológicos, podendo causar retardamento mental,<sup>5,6</sup> mas que podem ser evitadas ou minimizadas se o tratamento for iniciado ainda no primeiro mês de vida e prolongado por todo o primeiro ano.<sup>68-70</sup>

### Diagnóstico de toxoplasmose nos pacientes imunodeficientes propriamente ditos

Nos transplantados, principalmente de coração, fígado, rins e medula óssea, em pacientes com neoplasias submetidos à quimioterapia, e nos imunodeficientes, especialmente na



AIDS, a toxoplasmose causa quadros graves tanto nas primoinfecções (mais raras), quanto nas frequentes reativações de infecções latentes. Para o diagnóstico, a evidênciação do *Toxoplasma* tem, então, máxima importância. Por vezes, o parasito pode ser encontrado por simples coloração ou por imunofluorescência, como no lavado brocoalveolar na toxoplasmose pulmonar, quadro que se distingue da pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* por apresentar níveis extremamente elevados de desidrogenase láctica no soro.<sup>74</sup> No entanto, são necessárias técnicas mais sensíveis, como a inoculação no camundongo, ou o cultivo em fibroblastos,<sup>8,9</sup> a pesquisa de antígenos parasitários por imuno-histoquímica em material de biopsia, ou por reações imunológicas em líquidos orgânicos, como o cefalorraquidiano e, inclusive, na urina.<sup>11,12</sup> De muito maior sensibilidade, porém, é a pesquisa de segmentos característicos do DNA, por hibridização e, principalmente, por PCR.<sup>13-19</sup> O fato de as técnicas moleculares serem mais rápidas e independerem das condições imunológicas dos pacientes faz com que assumam papel de destaque no diagnóstico da infecção em pacientes imunodeficientes.

O diagnóstico imunológico nesses indivíduos é dificultado pelo comportamento anômalo do perfil sorológico, para o qual buscam-se ainda marcadores confiáveis, mormente para as reagudizações de infecções crônicas. Assim, em cerca de 50% das graves complicações oportunistas causadas pelo *Toxoplasma* nos imunodeficientes, o quadro sorológico se mantém com um perfil de infecção latente, não sendo incomum a ocorrência de sororreversão, com desaparecimento dos anticorpos antitoxoplasma e negatividade dos testes.

Investigação de anticorpos antitoxoplasma dos vários isótipos, no soro, por Pinon *et al.*<sup>76</sup> revelou anticorpos IgM em apenas 10% dos casos, de IgE em 20 a 25% e de IgA em cerca de 40%, os anticorpos IgG mostrando significativa elevação de títulos em 25%.<sup>60</sup> Fato importante, estes sinais sorológicos surgem, com frequência, antes das lesões e de suas manifestações clínicas, por vezes com meses de antecedência, mas de maneira transitória, interrompida, o que levou Pinon *et al.*<sup>76</sup> a recomendarem, nos imunodeficientes portadores de toxoplasmose latente, a pesquisa periódica, a cada 2 meses, de anticorpos IgA e IgE, como marcadores de risco de reativação. De modo semelhante, também foi observada a produção de anticorpos antitoxoplasma *in vitro* por linfócitos do sangue periférico 5 a 15 meses antes do estabelecimento de encefalite por toxoplasma.<sup>77</sup>

Na encefalite por toxoplasma, Potasman *et al.* referem maior carga de anticorpos IgG no líquido cefalorraquidiano do que no soro,<sup>78</sup> fato semelhante ao que se encontra no humor aquoso na toxoplasmose ocular. Essas cargas são expressas pelo título de anticorpos por miligrama de IgG, que se obtém dividindo os títulos encontrados pelas quantidades de IgG presentes, respectivamente no LCR e no soro. Entretanto, somente seria observada quando as lesões situam-se próximo às meninges.

Indicação importante da reagudização da toxoplasmose no imunodeficiente é a detecção do parasito no sangue, de maior sensibilidade pela PCR.<sup>13-19</sup>

### Diagnóstico de toxoplasmose ocular

As observações, no Brasil, de Fernando Gomes da Silveira, oftalmologista em Erechim, RS, e estudadas por Cláudio Magalhães Silveira *et al.*,<sup>79,80</sup> chamaram a atenção para a ele-

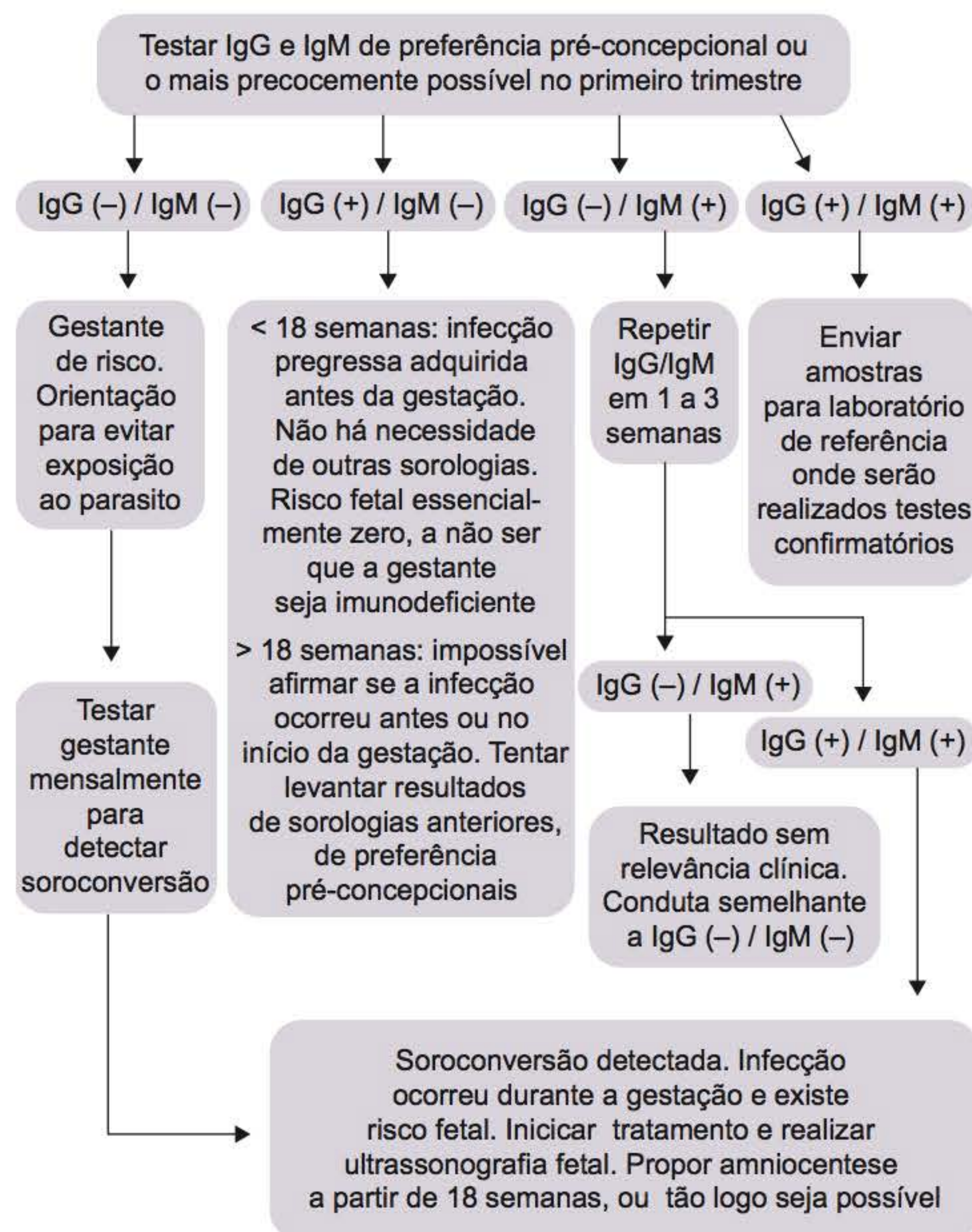
vada incidência de coriorretinite por toxoplasma na infecção adquirida na vida extrauterina, anteriormente considerada como apanágio da toxoplasmose congênita, presente no recém-nascido e podendo surgir tardiamente, mesmo após décadas.

Investigações mais recentes realizadas por grupos de pesquisa brasileiros apontam a participação de receptores *toll-like* e de polimorfismos em genes que participam da resposta inflamatória, tais como interferona gama, fator de necrose tumoral alfa, dentre outros, na suscetibilidade à coriorretinite por toxoplasma,<sup>81-83</sup> existindo também componente genético do parasito na gênese de infecções mais graves.<sup>84</sup>

Embora ocasionalmente encontrada em pacientes com perfil sorológico de fase aguda, em regra a toxoplasmose ocular ocorre em fase tardia da infecção, com o paciente apresentando um perfil de fase crônica. Em doentes com imunodeficiência pelo HIV, são frequentes as retinites por diversos agentes oportunistas, como o citomegalovírus, o herpes simples e o zóster, além do *Toxoplasma gondii*. Caracteristicamente na coriorretinite, a lesão ocular pelo *Toxoplasma* tem, como uma das marcas imunológicas, a produção intraocular de anticorpos antitoxoplasma. Em consequência, a carga de anticorpos IgG (título/mg de IgG) no humor aquoso resulta maior do que a carga respectiva no soro, o que é expresso pelo índice de Desmonts-Witmer, dado pelo quociente entre ambas as cargas. Originariamente, os títulos de anticorpos eram determinados pelo teste de Sabin-Feldman utilizando diluições de razão 2 ou 4, o que não permitia maior precisão. Desse modo, podia-se tomar como significativos de produção intraocular somente índices superiores a quatro ou mesmo a oito. Com a quantificação mais precisa dos anticorpos, pelo ensaio ELISA fornecendo valores expressos de maneira contínua, em unidades internacionais (UI/mL), pode-se atribuir valor diagnóstico a índices iguais ou maiores do que dois e meio. O resultado foi um nítido aumento da sensibilidade diagnóstica do índice de Desmonts-Witmer, como verificado por Petrilli *et al.*<sup>85</sup> A baixa avidéz dos anticorpos IgG no humor aquoso, como descrito por Vinhal *et al.*,<sup>86</sup> constitui outro bom marcador de toxoplasmose ocular, não raro em contraste com alta avidéz no soro. A presença de anticorpos IgA ou IgM para o *Toxoplasma*, no humor aquoso, parece representar um bom marcador de toxoplasmose ocular, porém, de maior valor diagnóstico é a avaliação comparativa de perfis de anticorpos no humor aquoso ou vítreo e no soro. Enquanto o indivíduo com anticorpos antitoxoplasma no soro, mas sem lesão ocular, não apresenta anticorpos intraoculares, ou ocasionalmente apenas anticorpos IgG reagindo com as mesmas bandas antigênicas que para o soro, na toxoplasmose ocular encontram-se anticorpos no humor aquoso ou no vítreo, detectados pelo teste de *immunoblot* com reatividade para bandas antigênicas diferentes daquelas do soro, ou mesmo mais intensas do que as correspondentes séricas.<sup>55,56</sup> Para o diagnóstico etiológico, outra possibilidade é a detecção de toxoplasmas intraoculares pela identificação de DNA parasitário por PCR. Ao investigarem o valor diagnóstico de algumas das técnicas referidas, Garweg *et al.*,<sup>87-90</sup> em um grupo de 27 pacientes, encontraram sensibilidades de 41% para o índice de Desmonts-Witmer, 28% para PCR, 22% para a determinação de IgA e de 15% para avidéz de IgG.

A Figura 26.4 sumariza o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.





**Figura 26.4** Sumário do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.

## ► Referências bibliográficas

- Francisco FM, de Souza SL, Gennari SM *et al.* Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in São Paulo municipality, sp, Brazil. *Rev Inst Trop São Paulo* 2006; 48 (3): 167-170.
- Cavalcante GT, Aguilar DM, Camargo LM *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol* 2006; 92 (3): 647-649.
- Varella IS, Canti ICT, Santos BR *et al.* Prevalence of acute toxoplasmosis among 41,112 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (2): 383-388.
- Fernandes GCVR, Azevedo RS, Amaku M *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma* infection in a metropolitan region of Brazil. *Epidemiol Infect* 2009; 137: 1809-1815.
- Remington JS, Macleod R, Thulliez P *et al.* Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO (eds). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Chapter 31, p. 947-1092, 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W. Saunders, 2006.
- Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (3): 941-945.
- Montoya JGM, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008; 47 (4): 554-566.
- Derouin F, Mazon MC, Garin YJF. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1597-600.
- Derouin F, Thulliez P, Candolfi E *et al.* Early prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis using amniotic fluid samples and tissue culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 423-425.
- Van Knapen F, Panggabene SO, Van Leusden J. Demonstration of *Toxoplasma* antigen containing complexes in active toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 645-650.
- Fachado A, Fonte L, Alberti E *et al.* Usefulness of the detection of *Toxoplasma gondii* antigens in AIDS patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1994; 36: 525-529.
- Avi L, Akao N, Bosompem KM *et al.* Development of membrane-based tests for the detection of urinary antigens and antibodies in human toxoplasmosis: preliminary studies in Ghanaian patients. *Acta Trop* 2005; 93 (2): 151-159.
- Cultrera R, Seraceni S, Contini C. Efficacy of a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting *Toxoplasma gondii* bradyzoite gene expression in human clinical specimens. *Mol Cell Probes* 2002; 16: 31-39.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (8): 1787-1792.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa J-M *et al.* Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994; 15: 695-699.
- Dupon M, Cazenave J, Pellegrin J-L *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (9): 2421-2426.
- Homan WL, Vercammen M, De Braekeller J *et al.* Identification of a 200 to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000; 30: 69-75.
- Jalal S, Nord CE, Lappalainen M, Escmid. Study Group on Toxoplasmosis. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (10): 937-939.
- Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC *et al.* Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics* 2009; 64: 171-176.
- Bastien P, Junas-Bilak E, Varlet-Marie E on behalf the ANOFEL *Toxoplasma*-PCR Quality Control Group. Three years of multilaboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 430-433.
- Buchbinder S, Blatz R, Rodloff R *et al.* Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 269-271.



22. Contini C, Seraceni S, Cultrera R *et al.* Evaluation of a real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoites genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retin-ochoroiditis. *Int J Parasitol* 2005; 35 (3): 275-283.
23. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR *et al.* Quantitative real-time polymerase chain accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63 (1): 10-15.
24. Bell AS, Randford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002; 18 (8): 337-342.
25. Duncan R. DNA microarrays analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol* 2004; 20 (5): 211-215.
26. Kim SK, Fourts AE, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* dysregulates INF-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol* 2007; 178 (8): 5154-5165.
27. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995; 172: 1561-1566.
28. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L *et al.* Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 2002; 186: 684-689.
29. Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA *et al.* *Toxoplasma gondii*: genotyping strain from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol* 2008; 118 (2): 221-227.
30. Nimri L, Pelloux H, Elkhatib L. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA and specific antibodies in high-risk pregnant women. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 (6): 831-835.
31. Cresti S, Ciacci C, Donati E *et al.* Evaluation of PCR methods for 5S-rDNA and p30 genes to detect *Toxoplasma gondii* in blood and other clinical samples. *New Microbiol* 2001; 24(2):171-4.
32. Fuentes I, Rodriguez MM, Domingo CJ *et al.* Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2368-71.
33. Kasper LH. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1989; 57: 668-672.
34. Ambroise-Thomas P, Okay T. Variations inter et intracépales de pathogénicité chez *Toxoplasma gondii*. Conséquences cliniques et épidémiologiques. *Bull Acad Natle Med* 1993; 177: 1411-21.
35. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*) *Science* 1948; 108: 660-663.
36. Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964; 6: 117-118.
37. Remington JS, Miller MJ, Brownlee I. IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* 1968; 41: 1082.
38. Niel G, Desmonts G, Gentilini M. Immunofluorescence quantitative et diagnostic sérologique de la toxoplasmose: introduction des unités internationales dans l'expression des positivité. *Path Biol* 1973; 21: 157-161.
39. Camargo ME, Leser PG, Guarnieri DB *et al.* Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. *Rev Bras Patol Clin* 1977; 13: 1-5.
40. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR *et al.* Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun* 1978; 21: 55-58.
41. Pelloux H, Ciapa P, Ambroise-Thomas P. Évaluation du système VIDAS pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose. *Ann Biol Clin* 1993; 50: 875-878.
42. Camargo ME, Silva SM, Leser PG *et al.* Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33: 213-218.
43. Hedman K, Lappalainen M, Seppala I *et al.* Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 1989; 159: 736-740.
44. Lappalainen M, Koskela P, Koskiniemi M *et al.* Toxoplasmosis acquired during pregnancy: Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J Infect Dis* 1993; 167: 691-697.
45. Araújo PR, Ferreira AW. Avidity of IgG antibodies against excrete/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41 (2): 142-147.
46. Franco EL, Walls KW, Sulzer AJ *et al.* Diagnosis of acute acquired toxoplasmosis with the enzyme-labeled antigen reversed immunoassay for immunoglobulin M antibodies. *J Immunoassay* 1983; 4: 373-393.
47. Desmonts G, Naot Y, Remington JS. Immunoglobulin M-Immunsorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 486-491.
48. Jacobs L, Lunde M. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol* 1957; 43: 308-314.
49. Camargo ME, Moura MEG, Leser PG. *Toxoplasma* serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989; 31: 279-285.
50. Danneman BR, Vaughan WC, Thulliez P *et al.* Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1828-1833.
51. Decoster A, Darcy F, Caron A *et al.* Anti P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 310-315.
52. Foudrinier F, Marx-Chemela C, Aubert D *et al.* Value of specific immunoglobulina A detection by two immucapture assays in the diagnosis of toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 585-590.
53. Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R *et al.* Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2952-2959.
54. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 1990; 11: 562-568.
55. Chumpitazi BFF, Boussaid A, Pelloux H *et al.* Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1479-485.
56. Gross O, Roos T, Appoldt D *et al.* Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1436-441.
57. Frenkel JK. Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens (*Toxoplasmins*). *Proc Soc Exp Biol Med* 1948; 68: 634-639.
58. Johnson Jr WD. Chronological development of cellular immunity in human toxoplasmosis. *Infect Immun* 1981; 33: 948-949.
59. Kahi S, Cazon GLN, Greenland T *et al.* A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 745-748.
60. Vallochi AL, Goldberg AC, Falcai A *et al.* Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clin Ophthalmol* 2008; 2(4): 837-848.
61. Egan CE, Sukhumavasi W, Butcher BA *et al.* Functional aspects of Toll-like receptors/MyD88 signaling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 2009; 156: 17-24.
62. Camargo ME, Leser PG, Leser WSP. Definição de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. *Rev Bras Patol Clin* 1977; 13: 113-127.
63. Pons JC, Sigrand C, Grangeot-Keros *et al.* Toxoplasmose congénitale: Transmission au fœtus d'une infection maternelle antéconceptionnelle. *Press Med* 1995; 24: 179-182.
64. Vogel N, Kirisits M, Michael E *et al.* Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunological competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis* 1996; 23:1055-1060.
65. Villena I, Chemla C, Quereux C *et al.* Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1079-1081.
66. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 1994; 118: 853-862.
67. Gavinet MF, Robert F, Firtion G *et al.* Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1276-1277.
68. Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M *et al.* Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1988; 318: 271-275.
69. Guerina NG, Hsu HW, Meissner C *et al.* Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med* 1994; 330: 1858-1863.
70. McAuley J, Boyer KM, Patel D *et al.* Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis. The Chicago collaborative treatment trial. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 38-72.
71. Djurkovic-Djakovic O, Romand S, Nobre R *et al.* Serological rebounds after one-year-long treatment for congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(1): 81-83.
72. Eskild A, Magnus P. Commentary: little evidence of effective prenatal treatment against congenital toxoplasmosis-the implications for testing in pregnancy. *Int J Epidemiol* 2001; 30(6): 1314-1315.
73. European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission on *Toxoplasma gondii*. *Brit J Obstet Gynecol* 2003; 110: 112-120.
74. Pugin J, Vanhems P, Hirschet B *et al.* Extreme elevations of serum lactic dehydrogenase differentiating pulmonary toxoplasmosis from pneumocystis pneumonia. *N Engl J Med* 1992; 326: 1226.



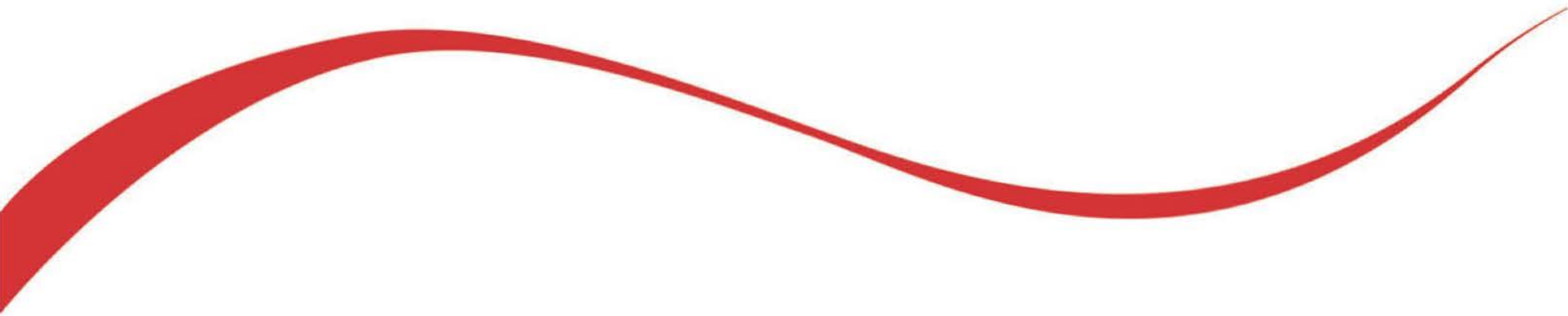
75. Garcia AGP, Bittencourt A. A placenta nas infecções hematogênicas: toxoplasmose. In: Bittencourt A (ed). Infecções congênitas transplacentárias. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.
76. Pinon JM, Foudrinier F, Mougeot G *et al.* Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. J Clin Microbiol 1995; 33: 878-884.
77. Vendrell JP, Reynes J, Huguet MF *et al.* *In vitro* synthesis of antibodies to *Toxoplasma gondii* by lymphocytes from HIV-1 infected patients. Lancet 1993; 342: 22-23.
78. Potasman I, Resnick L, Luft BJ *et al.* Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1988; 108: 48-51.
79. Silveira C, Belfort Jr R, Burnier Jr M *et al.* Acquired toxoplasma infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. Am J Ophthalmol 1988; 106: 362-364.
80. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D *et al.* An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. Amer J Ophthalmol 1992; 114: 136-144.
81. Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L *et al.* Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104 (8): 1187-1190.
82. Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI *et al.* The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009 May; 104(3): 451-455.
83. Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC *et al.* TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. Br J Ophthalmol 2008; 92(7): 986-988.
84. Bottós J, Miller RH, Unifesp Toxoplasmosis Group *et al.* Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of *Toxoplasma gondii*. Br J Ophthalmol 2009, 93(11): 1546-1550.
85. Petrilli AMN, Abreu MT, Camargo ME *et al.* Ocular toxoplasmosis diagnosis and aqueous humor IgG antibodies by a simplified ELISA technique. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 2097.
86. Vinhal FA, Pena JDO, Katina JH *et al.* Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis: detection of low avidity IgG specific to *Toxoplasma gondii*. Appl Parasitol 1994; 35: 1-7.
87. Matos K, Muccioli C, Belfort Junior R *et al.* Correlation between clinical diagnosis and PCR analysis of serum, aqueous, and vitreous samples in patients with inflammatory eye disease. Arq Bras Oftalmol 2007; 70(1): 109-114.
- 87a. Garweg JG, Ventura AC, Hallberstadt M *et al.* Specific antibody levels in the aqueous humor and serum of two distinct populations of patients with ocular toxoplasmosis. Int. J Med Microbiol 2005 Aug; 295: 287-295.
88. Westeneng AC, Rothova A, De Boer JH *et al.* Infectious uveitis in immunocompromised patients and the diagnostic value of polymerase chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient in aqueous analysis. Am J Ophthalmol 2007; 144(5): 781-785.
89. Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F *et al.* Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2008; 46(6): 1965-1967.
90. Talabani H, Asseraf M, Yera H *et al.* Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2131-2135.







## Seção 5 | Helmintos





- Capítulo 27 | Esquistossomose Mansônica, 319
- Capítulo 28 | Filariose Bancroftiana, 329
- Capítulo 29 | Hidatidose, 337
- Capítulo 30 | Neurocisticercose, 347
- Capítulo 31 | Toxocaríase, 351



## Capítulo 27

---

# Esquistossomose Mansônica

*Edward Oliveira, Pedro Paulo Chieffi e  
Sumie Hoshino-Shimizu*

- Introdução, 320
- Diagnóstico laboratorial, 320
- Considerações finais, 325
- Referências bibliográficas, 325



## ► Introdução

A infecção por *Schistosoma mansoni*, única espécie do gênero que ocorre de modo autóctone no Brasil, representa uma das principais endemias parasitárias no país. Inquérito coprológico com abrangência nacional, efetuado na década de 1950, avaliou em 10% a prevalência dessa helmintose no Brasil. Levantamentos com tal amplitude não foram mais realizados; todavia, pesquisas mais recentes sob responsabilidade da Fundação Nacional de Saúde (Funasa) indicam frequência semelhante, com ocorrência de casos autóctones em 17 das 27 unidades da Federação.<sup>1</sup> Dados publicados pelo Ministério da Saúde revelam a notificação de 113.712 novos casos de infecção esquistossomótica em todo território brasileiro no período compreendido entre 1995 e 2007, envolvendo todas as regiões, com 9.357 óbitos. Embora o número de indivíduos infectados pelo trematódeo não tenha sofrido redução apreciável nas últimas décadas, dados do Ministério da Saúde indicam diminuição da morbi-mortalidade causada pela endemia. Assim, notou-se queda significativa do coeficiente de mortalidade específica por esquistossomose no Brasil, que em 1980 era 0,69/100.000 habitantes e, ao final da década seguinte, chegou a 0,29 óbito para cada 100.000 habitantes. Tal resultado tem sido atribuído a ações de controle efetuadas pelo Ministério e Secretarias Estaduais de Saúde, decorrentes da horizontalização do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), iniciado em 1976, cujo objetivo principal de controlar a transmissão da endemia não foi atingido, conseguindo, entretanto, diminuir consideravelmente a gravidade da infecção em termos populacionais.

*Schistosoma mansoni* é um trematódeo digenético que infecta seres humanos e algumas outras espécies de vertebrados que entram em contato com coleções de água doce infestadas por cercárias eliminadas por moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, os quais atuam como hospedeiros intermediários. No Brasil encontram-se 11 espécies de *Biomphalaria*, contudo apenas três – *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* – são responsáveis pela transmissão da esquistossomose.

Do ponto de vista clínico e anatomopatológico, a esquistossomose mansônica pode ser dividida em três grupos, que apresentam morbidade crescente nas formas:

- Intestinal
- Hepatointestinal
- Hepatoesplênica
  - Hepatoesplênica compensada
  - Hepatoesplênica descompensada.

É preciso considerar ainda que, em áreas endêmicas, a maioria dos casos se apresenta na forma intestinal, muitas vezes assintomática ou oligossintomática.

## ► Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica pode ser realizado por meio de métodos parasitológicos, anatomopatológicos ou imunológicos. Recentemente, desenvolveu-se técnica molecular de diagnóstico com resultados promissores.<sup>2</sup>

A demonstração de ovos do parasito nas fezes ou material de biopsia de indivíduos infectados constitui diagnóstico de certeza na esquistossomose. Todavia, resultados negativos em

exames coprológicos, ou mesmo anatomopatológicos, não excluem a possibilidade de infecção, principalmente no caso de pacientes com infecção leve, resultante de carga baixa de helmintos ou, ainda, pacientes com infecção crônica, os quais desenvolveram grau apreciável de fibrose na submucosa intestinal. Nesses casos, nem sempre é fácil encontrar ovos de *S. mansoni* nas fezes nas condições que caracterizam inquéritos epidemiológicos, nos quais habitualmente uma única amostra fecal de cada indivíduo é examinada.<sup>3,4</sup> Rabello *et al.*, examinando por meio de técnicas parasitológicas e biopsia retal 217 pacientes que apresentavam testes imunológicos positivos para esquistossomose, encontraram elementos esquistossomóticos em apenas 68%.<sup>5</sup>

### ▪ Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansônica pode ser dado por meio de técnicas qualitativas, que apenas detectam a existência de ovos do parasito nas fezes do paciente, ou pelo emprego de técnicas quantitativas, que determinam o número de ovos presentes por grama de fezes.

A possibilidade de avaliar a intensidade, e não apenas a prevalência de infecção com o uso de técnicas quantitativas, bem como a relação existente entre intensidade de infecção e morbidade,<sup>6-8</sup> fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendasse o emprego de técnicas coprológicas quantitativas para o diagnóstico da esquistossomose, especialmente em inquéritos populacionais.

Embora existam dados sugerindo variação na quantidade de ovos de *S. mansoni* eliminados pelas fezes por um mesmo paciente examinado em dias diferentes<sup>9,10</sup> e em diferentes porções do mesmo bolo fecal,<sup>11</sup> a análise de pacientes por períodos relativamente longos ou de grupos de indivíduos, em vez de pacientes isolados, indica tendência à eliminação estável de ovos de *S. mansoni* nas fezes de seres humanos infectados.<sup>12</sup> Por outro lado, a repetição dos exames, com aumento da quantidade de amostras examinadas de um mesmo indivíduo, eleva a sensibilidade das técnicas coprológicas de diagnóstico.<sup>5,13</sup>

É preciso lembrar, todavia, que o emprego de técnicas coprológicas com a intenção de determinar, em nível populacional, a prevalência de infecção esquistossomótica pode resultar em avaliações imprecisas, em razão de um conjunto de fatores que podem provocar variações na presença e quantidade de ovos de *S. mansoni* nas fezes de indivíduos infectados.<sup>3</sup> Assim, a ocorrência de infecções unissexuais ou de indivíduos infectados por pequeno número de vermes, a queda na postura de fêmeas do trematódeo com o passar do tempo, e a dificuldade progressiva na migração dos ovos pela submucosa e mucosa intestinais de pacientes que desenvolvem fibrose nessa região justificam possíveis falhas no resultado de exames parasitológicos de fezes.

Outro aspecto a ser destacado na avaliação da prevalência de infecção esquistossomótica em grupos populacionais é a dificuldade crescente de diagnosticar indivíduos infectados empregando-se técnicas coprológicas com o decréscimo das taxas de prevalência, após a vigência de programas de controle da endemia.

### Métodos coprológicos qualitativos

Diversas técnicas coprológicas qualitativas apropriadas para o diagnóstico da infecção humana por *S. mansoni* são referidas na literatura. São técnicas usadas preferencialmente para diagnóstico em termos individuais, devendo



ser evitadas em estudos epidemiológicos ou na avaliação de programas de controle quando é importante estimar a carga parasitária.<sup>14</sup>

Serão citadas apenas as mais utilizadas em nosso meio: o método de sedimentação espontânea, a técnica de eclosão de miracídios e o método de Kato – este último, contudo, será considerado mais adiante com a modificação introduzida por Katz *et al.*, que o transforma em técnica quantitativa de diagnóstico.<sup>15</sup>

### Método de sedimentação espontânea

Este método foi originalmente descrito por Adolfo Lutz e, em seguida, padronizado por Hoffman, Pons e Janer. Posteriormente, foi modificado por outros autores que introduziram alterações no processo de filtração de fezes.<sup>3</sup> Baseia-se na possibilidade de concentração de ovos de helmintos e cistos de protozoários presentes nas fezes de pacientes infectados e, principalmente, ovos de *S. mansoni* por meio de processo de sedimentação de partículas submetidas à ação gravitacional, em frasco especial com fundo cônico. Três a quatro gramas da amostra fecal devem ser emulsionados em água e filtrados através de tela metálica ou gaze para o cálice de sedimentação. Transcorrido tempo suficiente para que ocorra sedimentação do material em suspensão, transfere-se, com auxílio de pipeta, parte do sedimento para lâmina de microscopia, a qual será examinada a seguir. Podem-se acrescentar duas gotas de lugol ao sedimento, se houver interesse em diagnosticar a existência de cistos de protozoários. Convém lembrar que, se o sedimento permanecer muito tempo exposto diretamente à luz, a eclosão de ovos de *S. mansoni*, com a liberação de miracídios, poderá ser estimulada.

Por sua simplicidade e baixo custo, essa técnica é bastante utilizada para o diagnóstico da esquistossomose. Rabello *et al.* referem resultados comparáveis quando a cotejaram com o método de Kato-Katz.<sup>5</sup> Deve-se destacar, contudo, a impossibilidade de estimar a carga parasitária com o emprego desse método.

### Teste de eclosão de miracídios

Este teste baseia-se na estimulação da eclosão de miracídios contidos em ovos de *S. mansoni* presentes nas fezes de indivíduos infectados quando uma suspensão de fezes em água é adequadamente exposta à ação de luz solar ou artificial. Utilizando-se frasco de gargalo fino e longo para expor a suspensão de fezes e iluminando-se preferencialmente a parte superior do frasco, os miracídios são aí concentrados, podendo ser diagnosticados a olho nu ou com o auxílio de lente dotada de pequena capacidade de aumento. Dispensa-se, com o emprego dessa técnica, o uso de microscopia, viabilizando o exame de amostras fecais em condições de trabalho de campo, além de permitir a avaliação da viabilidade dos ovos de *S. mansoni*.<sup>3</sup>

Diversos autores utilizaram o teste de eclosão de miracídios com bons resultados em áreas endêmicas<sup>16,17</sup> ou mesmo em regiões não endêmicas com casos importados de pacientes doentes,<sup>18</sup> embora, neste caso, os resultados tendam a ser inferiores aos obtidos com outras técnicas, como consequência do baixo índice de eliminação de ovos viáveis de *S. mansoni* pelos pacientes.<sup>3</sup> Lemos *et al.* relataram melhores resultados no diagnóstico de infecção esquistossomótica e também no controle de cura após tratamento específico, em área não endêmica, quando associaram o teste de eclosão de miracídios e o método de Kato-Katz.<sup>19</sup>

### Métodos coprológicos quantitativos

A possibilidade de se estimar a carga parasitária e a morbidade resultante da infecção esquistossomótica são os fatores responsáveis pelo incremento no uso de métodos coprológicos quantitativos no diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica, verificado ultimamente. Entre os diversos métodos quantitativos descritos na literatura, os mais utilizados para o diagnóstico da esquistossomose são os de Barbosa, de Bell, de Kato-Katz e de Teesdale.

### Método de Barbosa

Descrito em 1967, trata-se de método simples, resultante da modificação do método de sedimentação espontânea.<sup>7</sup> Preconiza a utilização de volume conhecido de sedimento fecal, após emulsão de 5 g de fezes em 50 ml de água. Passados 60 min, o sedimento é separado, seu volume determinado e examina-se a alíquota correspondente a 0,1 ml. Calcula-se o número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes [OPG] com a seguinte fórmula:

$$\text{OPG} = \frac{\text{Nº de ovos por lâmina} \times \text{Volume do sedimento}}{\text{Volume do sedimento} \times \text{Peso da amostra de fezes}}$$

### Método de Bell

O método de Bell<sup>20</sup> não tem sido muito utilizado em condições de trabalho de campo provavelmente em virtude de sua maior complexidade. Baseia-se na filtração, sob vácuo, de emulsão de fezes através de duas telas de malhas finas justapostas (500 e 350 µm de abertura, respectivamente) e, a seguir, por folha de papel de filtro (Whatman 541) que retém os ovos de *S. mansoni*. Acrescentando-se solução saturada de ninidrina, obtém-se a coloração dos ovos, que são facilmente visualizados e contados ao microscópio.

### Método de Kato-Katz

O método coprológico descrito por Kato para o diagnóstico de ovos de helmintos nas fezes se tornou conhecido no Ocidente após publicação de Komiya e Kobayashi.<sup>21</sup> Tratava-se, originalmente, de técnica qualitativa que permitia quantificação se a amostra a ser examinada fosse previamente pesada.<sup>22</sup> Todavia, após adaptação proposta por Katz *et al.*,<sup>15</sup> transformou-se em método quantitativo, caracterizado por extrema simplicidade metodológica, passando a ser denominado método de Kato-Katz.

De acordo com essa técnica, a amostra fecal é quantificada por meio de um cartão perfurado, conseguindo-se uma alíquota de material correspondente, em média, a 43,7 mg. As fezes assim obtidas deverão ser passadas através de tela provida de 105 malhas por polegada quadrada, que permite a passagem dos ovos de helmintos, restando, todavia, detritos fecais mais grosseiros. A seguir, as fezes são espalhadas sobre lâmina de microscopia por meio de lamínula de papel celofane permeável, previamente tratado por, no mínimo, 24 h com solução de verde malaquita em glicerina.

Com a evaporação da água, a glicerina age sobre o esfregaço fecal, clarificando-o. Torna-se, assim, possível a visualização ao microscópio dos ovos de *S. mansoni* presentes no material. Na determinação, o número de ovos no esfregaço e sua multiplicação por 24 equivalerão aproximadamente ao número total de ovos de *S. mansoni* eliminados por grama de fezes.

Essa técnica, além de ser simples, permite a estocagem da lâmina preparada para leitura posterior, tornando possível a adoção de esquemas de supervisão do diagnóstico laboratorial e facilitando seu emprego em condições de trabalho de campo.



Nessas circunstâncias, de acordo com Coura e Conceição,<sup>23</sup> impõe-se a utilização do método de Kato-Katz em face de sua sensibilidade, baixo custo e facilidades operacionais. É desaconselhável, entretanto, seu uso em amostras fecais diarreicas.

### Método de Teesdale

Este método foi descrito em 1976 por Teesdale e Amin.<sup>24</sup> Assemelha-se ao método de Kato-Katz sob o aspecto metodológico, diferindo deste pelo fato de obter-se o esfregaço das fezes a serem examinadas por meio de pressão entre duas lâminas de microscopia.

Em condições de campo, Chitsulo *et al.* obtiveram resultados semelhantes aos do método de Kato-Katz, enfatizando que o método de Teesdale tem custo menor, pois dispensa o uso de reagentes químicos, além de permitir a avaliação da viabilidade dos ovos de *S. mansoni* existentes.<sup>25</sup> Todavia, não se presta à estocagem das lâminas, obrigando a sua leitura imediata, fato que dificulta seu emprego em trabalhos de campo.

### Novas técnicas de diagnóstico parasitológico

O diagnóstico de certeza ou verdadeiro é obtido por técnicas de detecção direta do agente parasitário ou de seu componente em amostra fecal, como já referido anteriormente. Desse modo, novas técnicas têm sido desenvolvidas mediante o refinamento daquelas conhecidas ou incorporando outros conhecimentos tecnológicos, visando ao aumento de sensibilidade diagnóstica. A seguir, algumas técnicas potencialmente aplicáveis serão apresentadas; no entanto, aguarda-se por mais avaliações no aspecto referente ao desempenho diagnóstico.

#### Técnica de sedimentação diferencial

Recentemente, Coelho *et al.*<sup>26</sup> descreveram esta técnica em que a amostra fecal, preparada em solução salina a 3%, é submetida a fluxo contínuo através de placa porosa que permite passagem de material de baixa densidade, apreendendo o sedimento no qual ficariam retidos ovos de *S. mansoni*. Comparando-se as amostras examinadas por essa técnica e pelo método original de Kato-Katz, esses autores obtiveram resultados bastante satisfatórios.

#### Técnica rápida para três amostras fecais

Foi desenvolvido um kit denominado TF-test® (*three fecal test*),<sup>27</sup> que permite processar em uma única etapa as amostras de fezes colhidas em 3 dias diferentes. A técnica possibilita maior encontro de ovos de helmintos e cisto de protozoários, mostrando-se útil para o diagnóstico da esquistossomose. Constitui uma ferramenta de interesse para a utilização em programa de controle da esquistossomose, em conjunto com outras parasitoses intestinais.<sup>28</sup>

#### Técnica com uso de esferas paramagnéticas

Na tentativa de melhorar a sensibilidade diagnóstica da técnica parasitológica em áreas de baixa endemicidade para esquistossomose, foi descrita uma técnica em que o sedimento, obtido por técnica de Richie, é incubado com esferas paramagnéticas.<sup>29</sup> Em um campo magnético, observou-se a separação dos ovos de *S. mansoni*. Essa técnica parte com uma grande massa fecal (30 g), para detectar, em média, 1,3 ovo por grama de fezes.

### ■ Técnicas de diagnóstico molecular

Pontes *et al.*<sup>2</sup> desenvolveram técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando como *primer* uma sequência de DNA altamente repetitiva no genoma de *S. mansoni*, a qual

permitiria identificar a existência do DNA parasitário no soro e nas fezes de indivíduos infectados. Lier *et al.*<sup>30</sup>, anos mais tarde, descreveram técnica de PCR em tempo real para detecção de DNA de *S. japonicum* em amostras fecais. Tal técnica revelou elevada sensibilidade, permitindo diferenciar *S. japonicum* de outras espécies do gênero *Schistosoma* e de outros helmintos parasitos intestinais.

Recentemente, Gomes *et al.*<sup>31</sup> relatam o desenvolvimento de sistema denominado PCR-ELISA, o qual permite amplificação enzimática de determinadas regiões do DNA parasitário mesmo quando presente em baixa concentração.

### ■ Diagnóstico anatomopatológico

Dentre os diversos órgãos nos quais é possível demonstrar-se a existência de ovos de *S. mansoni* por meio de biopsias, o único que tem sido submetido a esse tipo de exame com certa frequência é a mucosa retal.

A biopsia retal foi proposta como técnica de diagnóstico anatomopatológico da esquistossomose, em 1943, por Ottolina e Atencio (*apud* WHO, 1985),<sup>9</sup> tendo sido, posteriormente, padronizada para permitir análise mais precisa da atividade da infecção esquistossomótica.<sup>32</sup>

A retirada de pequeno fragmento da mucosa retal, na altura das válvulas de Houston, permite o diagnóstico da esquistossomose mansônica por meio da identificação de ovos do trematódeo, com maior frequência do que quando se utiliza apenas um exame coprológico pela técnica da sedimentação espontânea ou de Kato-Katz.<sup>4</sup> Os resultados tornam-se, todavia, comparáveis quando são realizados exames coprológicos de 2 a 5 amostras de fezes. Por esse motivo, além das evidentes desvantagens operacionais, a biopsia retal tem sido utilizada apenas na avaliação da atividade de fármacos antiesquistossomóticos.<sup>9,32</sup>

### ■ Diagnóstico imunológico

A infecção causada por *S. mansoni*, na fase aguda e em pacientes com alta carga parasitária, pode ser facilmente diagnosticada por meio do encontro de ovos nas fezes, empregando técnicas parasitológicas. Entretanto, na fase crônica da infecção, é muito mais difícil encontrar ovos nas fezes, cuja escassez é atribuída a diversos fatores. É importante destacar que, na infecção crônica, a resposta imune celular é mais intensa e a proliferação do tecido conectivo, juntamente com a formação de pseudotubérculos em torno do ovo, pode prevenir o escape deste da mucosa para o lúmen do intestino; e, como já mencionado, o verme-fêmea de *S. mansoni* perde gradativamente sua capacidade de oviposição, reduzindo, assim, o número total de ovos.<sup>33</sup>

Por outro lado, em decorrência da implantação dos Programas de Controle e Vigilância da Esquistossomose, foi possível observar decréscimo substancial tanto da prevalência como da intensidade de infecção por *S. mansoni* em pacientes e indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas para a doença. Nessas circunstâncias, os testes sorológicos prestam inestimável auxílio, complementando os dados parasitológicos.

Os testes imunodiagnósticos podem ser empregados no diagnóstico da esquistossomose avançada, em portadores de baixa carga parasitária, nos casos de infecção unissexuada, infecção com oviposição parasitária irregular e de outras situações peculiares, as quais limitam as técnicas parasitológicas. Infelizmente, a maioria dos testes imunodiagnósticos



de detecção da reação antígeno/anticorpo desenvolvidos até o momento para o diagnóstico da esquistossomose, embora sejam de demonstração prática de anticorpos/antígenos, não são rotineiramente utilizados de modo efetivo. Esses testes ficaram limitados apenas para alguns laboratórios de diferentes instituições no Brasil, como o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), e no exterior, como os Centers for Disease Control and Prevention (CDC), para diagnóstico e pesquisa e, às vezes, para avaliação epidemiológica piloto. Portanto, ainda não dispomos de um teste imunodiagnóstico que seja prático, sensível, específico e barato, que supra as limitações do diagnóstico parasitológico.<sup>34</sup> Alguns desses testes serão abordados a seguir por servirem de base para a busca de marcadores imunológicos para infecção ativa e para infecção passada; para a determinação da morbidade; para o desenvolvimento de novos testes mais sensíveis e específicos; e também por serem tecnicamente promissores para o monitoramento na quimioterapia em casos de esquistossomose mansônica.

### Pesquisa de anticorpos

A maior parte dos testes imunológicos descritos para o diagnóstico da esquistossomose é indireta e se aplica à detecção de anticorpos. A positividade em um desses testes deverá ser interpretada em termos de probabilidade, por não definir a existência de infecção por *S. mansoni*, o que indica somente a existência da resposta do sistema imune do hospedeiro a determinados antígenos parasitários.

A reação intradérmica contra antígeno de verme adulto foi bastante empregada nas décadas de 1970 e 1980. Devido a sua praticidade, baixo custo e resultado imediato, a reação intradérmica era a metodologia preconizada pela OMS para ser empregada em estudos populacionais de larga escala.<sup>35,36</sup> No entanto, a baixa sensibilidade em crianças e as reações cruzadas obtidas em indivíduos expostos a cercárias de outros trematódeos, parasitos de aves, répteis e outros animais, fizeram com que a reação fosse gradativamente abandonada.<sup>37</sup>

O valor da reação periovular no diagnóstico da esquistossomose foi bem avaliado nos trabalhos realizados anteriormente.<sup>38-40</sup> Essa técnica não foi bem difundida aqui no Brasil, entretanto, é usada na Venezuela como padrão-ouro em áreas de baixa endemicidade, com sensibilidade variando de 92 a 100% e especificidade de 96 a 100%.<sup>41</sup>

A reação de hemaglutinação indireta, usando hemácias humanas sensibilizadas com antígenos de *S. mansoni*, foi padronizada, aperfeiçoada e avaliada por grupo de pesquisadores, nas décadas de 1970 e 1980.<sup>42-44</sup> Quando essa técnica foi empregada em uma população residente no Vale do Paraíba, obteve-se sensibilidade de 96% e especificidade de 97,4%.<sup>45</sup> Em estudo publicado, no qual um kit comercial (Fumouze Laboratories, Levallois-Perret, França) foi usado para diagnosticar a esquistossomose em turistas holandeses que haviam visitado o continente africano, obteve-se sensibilidade de 88% e especificidade de 98,9%, considerando-se o título de corte de 1:160.<sup>46</sup>

Outras técnicas sorológicas, como a reação de fixação do complemento e a floculação,<sup>47,48</sup> bem como o radioimunoensaio,<sup>49</sup> já foram utilizadas para estudos populacionais; hoje, no entanto, foram abandonadas.

A reação de imunofluorescência indireta (IFI) com cortes congelados de vermes adultos para o diagnóstico da esquistossomose mansoni foi padronizada no final da década de 1970. Nesses estudos, obteve-se sensibilidade na ordem de 95% e especificidade de 99%,<sup>50</sup> taxas próximas às relatadas por outros autores.<sup>51</sup> Com o uso da IFI é possível obter uma série

de informações sobre peculiaridades da resposta imunológica nas apresentações clínicas da esquistossomose, isto é, a identificação das classes de anticorpos anti-*S. mansoni* tem produzido informações quanto ao estágio e à gravidade da infecção. Um exemplo dessa abordagem é a detecção de anticorpos IgA, por meio da IFI, em pacientes portadores da esquistossomose mansoni nas manifestações agudas ou recentes. Esses anticorpos IgA não são detectados nos pacientes portadores da forma crônica. Nos portadores da manifestação aguda, também é possível detectar anticorpos IgM em altos títulos, que estão em baixos títulos ou ausentes nos pacientes portadores da manifestação crônica.<sup>52</sup>

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores padronizou a IFI, usando cortes parafinados de vermes adultos de *S. mansoni* para pesquisa de anticorpos IgM contra antígenos polissacarídicos presentes no tubo digestivo dos vermes.<sup>53</sup> Nessa técnica, embora apresente o mesmo desempenho diagnóstico em relação à IFI, usando cortes congelados de vermes adultos, o transporte e a armazenagem das lâminas podem ser à temperatura ambiente.<sup>54-57</sup> Em razão disso, esse método tem sido usado como exame complementar no diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e por laboratórios da rede privada.

O ensaio imunoenzimático (ELISA)<sup>58,59</sup> e algumas derivações a partir do ELISA, como o dot-ELISA<sup>60</sup> e o Dot-Dye,<sup>61-63</sup> têm sido extensivamente usados no desenvolvimento de testes para o diagnóstico da esquistossomose mansoni.

Diferentes preparações antigênicas vêm sendo experimentadas no ELISA. Entretanto, o antígeno ideal deve ter boa produtividade e facilidade de obtenção, elevada estabilidade em condições simples de armazenagem, capacidade antigênica e apresentar sensibilidade e especificidade quando empregado no ELISA.<sup>34</sup> Os mais usados são os extratos brutos, preparados a partir da ruptura de vermes, larvas ou ovos. O extrato total de vermes adultos é facilmente obtido em grande quantidade e é mais reativo contra soro de pacientes infectados, produzindo bons índices de sensibilidade e especificidade em relação aos apresentados pelo ensaio de ELISA, os quais utilizam extrato larval.<sup>64,65</sup>

Por outro lado, antígenos purificados a partir do extrato total de vermes adultos ou de ovos apresentam melhor desempenho diagnóstico quando empregados no imunodiagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Entre outras preparações purificadas usadas no diagnóstico da esquistossomose, incluem-se o antígeno *gut-associated polysaccharide* (GASP),<sup>66,67</sup> fração do extrato total de vermes adultos solúvel em ácido tricloroacético,<sup>67-70</sup> antígenos excretados e secretados de vermes adultos,<sup>71</sup> proteína de choque térmico de 70 kDa<sup>72</sup> e proteínas de 31 e 32 kDa, conhecidas como Sm31 e Sm32.<sup>73-75</sup>

Um teste ELISA, que contou com antígenos do tegumento do verme, apresentou sensibilidade de 99% e especificidade de 87,5%, tendo como exame de referência a técnica de Kato-Katz.<sup>76</sup> Um antígeno microsomal (MAMA)<sup>77-80</sup> está sendo usado nos imunoenaios de ELISA e *Western blot* na rotina dos CDC em Atlanta (EUA).

Estudos individuais e multicêntricos sugerem que o extrato de ovos (*Schistosoma egg antigen* – SEA) apresenta maiores índices de sensibilidade e especificidade em relação ao extrato de vermes adultos de *S. mansoni*.<sup>80,81</sup> Em um estudo detalhado, no qual pacientes portadores de esquistossomose foram examinados por diferentes testes, o ELISA, usando o SEA como antígeno, apresentou mais sensibilidade (98%) e especifici-



dade (97%), seguido pelo ensaio com extrato de vermes adultos (82,4 e 97%, respectivamente).<sup>82</sup>

O uso de frações parcialmente purificadas dos ovos de *S. mansoni* pode produzir imunoenaios com altos índices de sensibilidade e especificidade. A fração catiônica do extrato de ovos (CEF6) tem sido a mais usada no diagnóstico da esquistossomose. Em um estudo multicêntrico, no qual também foi usado o CEF6 como antígeno, o ELISA apresentou sensibilidade de 91% e especificidade de 90% em uma coleção de amostras de soro coletadas de pacientes parasitologicamente bem definidos.<sup>51</sup>

Um antígeno heterólogo denominado *haemocyanin from keyhole limpet* extraído do molusco *Megathura cremulata* (KLH) tem sido usado no ELISA para diagnóstico da infecção por *S. mansoni*, *haematobium* e *japonicum*.<sup>83-86</sup> O KLH também tem sido usado no ELISA para diferenciação das formas aguda e crônica da esquistossomose mansoni e vesical.<sup>62,86-89</sup>

Em geral, métodos que utilizam antígenos purificados, recombinantes ou peptídeos sintéticos demonstram maior especificidade que aqueles que empregam extratos totais. Nesse contexto, várias proteínas recombinantes foram testadas quanto a sua reatividade contra soros de pacientes infectados com *S. mansoni*. Entretanto, poucas delas foram testadas quanto ao potencial diagnóstico de pacientes portadores de esquistossomose no teste ELISA. Entre essas proteínas, temos glutatona S-transferase P-28,<sup>90</sup> *serine proteinase inhibitor-like molecule*,<sup>91</sup> proteína de choque térmico de 70 kDa HSP-70,<sup>72</sup> tropomiosina<sup>92</sup> e catepsina B e L.<sup>93</sup> A catepsina B (Sm 31) juntamente com a asparaginil peptidase (Sm 32) foram as primeiras a atrair a atenção dos pesquisadores, por causa da sua habilidade de induzir precoce e fortemente a produção de anticorpos em animais e humanos.<sup>94</sup> Uma fusão recombinante das Sm 31 e 32 foi produzida<sup>95</sup> e demonstrou ser um antígeno promissor à época do teste.<sup>45,96</sup>

Tendo como base a sequência de aminoácido da Sm 31,<sup>9</sup> selecionamos e sintetizamos quimicamente cinco peptídeos, que foram usados como antígenos em um teste ELISA. Este ensaio demonstrou sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,6% quando empregado em amostras de soro coletadas de indivíduos que foram positivos e negativos para ovos de *S. mansoni* nas fezes, respectivamente.<sup>97,98</sup>

### Pesquisa de antígenos

Existem evidências de que hospedeiros infectados, incluindo o homem, apresentam diferentes antígenos de *S. mansoni* livres ou complexados com anticorpos (imunocomplexos) circulantes no organismo. A maioria das pesquisas tem se concentrado em dois glicoconjugados: antígeno circulante anódico (CAA) e antígeno circulante catódico (CCA).<sup>99-102</sup> Esses antígenos produzidos pelo epitélio do tubo digestivo do verme adulto são detectáveis aproximadamente de 3 a 5 semanas após a infecção, dependendo de sua intensidade. Podem ser encontrados na urina, no soro, no leite (somente CCA), no fígado, nos rins e no baço do hospedeiro.<sup>103</sup>

Além de CAA e CCA, vários outros antígenos circulantes, associados a diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, têm sido descritos, como exemplo: o Sm 31/32,<sup>104-106</sup> um outro antígeno de 70 kDa,<sup>107</sup> e o glutatona S-transferase 28 kDa.<sup>108</sup>

Os ensaios destinados à detecção desses antígenos em fluidos biológicos (soro e urina) de pacientes possibilitaram diferenciar uma infecção ativa de uma infecção passada. Os primeiros ensaios, todavia, por empregarem anticorpos policlonais, revelaram resultados pouco sensíveis.<sup>109</sup> Atualmente, com o uso dos anticorpos monoclonais, esses imunoenaios tornaram-se altamente específicos e de boa sensibilidade.

Desse modo, uma variedade de ensaios tem sido usada para detectar antígenos circulantes, incluindo *hemaglutinação indireta*,<sup>110</sup> *imunoensaio com esferas magnéticas*<sup>111</sup> e *imuno-cromatografia*.<sup>112</sup> Geralmente, os imunoenaios para detecção de antígenos circulantes se baseia na captura do antígeno em ensaios de duplo anticorpo com anticorpos monoclonais ou policlonais, com especificidade aos epítopos do antígeno. Há sempre uma correlação positiva entre os níveis de antígenos circulantes, detectados por esses imunoenaios, e quantidade de ovos de *S. mansoni* excretados pelos hospedeiros.<sup>113,114</sup> Analogamente ao que acontece em alguns testes para detecção de anticorpos, ensaios destinados à detecção de antígenos sofrem perda da sensibilidade quando aplicados em pacientes portadores de baixa carga parasitária.<sup>115</sup> Além disso, os imunoenaios que empregam CCA e CAA não têm a propriedade de diferenciar a infecção causada pelas três diferentes espécies de *Schistosoma*, isto é, esses antígenos não são espécies peculiares.

### Avaliação da quimioterapia por detecção de anticorpos ou de antígenos

Após o tratamento quimioterápico de pacientes, observa-se elevação dos níveis de anticorpos específicos em um período que varia de 1 a 3 semanas, acarretada pela destruição dos parasitos.<sup>116</sup> Subsequentemente, ocorre queda gradual até a negatização dos anticorpos, que poderá variar de 6 meses até 3 anos ou mais, conforme o tipo de ensaio utilizado.<sup>117</sup> Em casos de falha no tratamento, os anticorpos não desaparecem e, uma vez repetido o tratamento, os níveis de anticorpos voltam a se elevar.<sup>116,118,119</sup>

Anticorpos das classes IgG1, IgG4, IgM e IgE são sugeridos como potenciais marcadores imunológicos para a avaliação do tratamento de pacientes,<sup>52,120</sup> porém aguardam ainda por comprovações definitivas.

Foi verificado ainda que a reação periovular é de grande valia para o acompanhamento de pacientes tratados em área endêmica de esquistossomose em que a intensidade de infecção é baixa.<sup>118</sup> Nos pacientes curados, essa reação mostra queda de anticorpos no 3º mês, chegando à negatização invariavelmente no 6º mês após a quimioterapia.

Os ensaios para detecção de antígenos circulantes são bastante oportunos para a verificação da eficácia terapêutica. Os antígenos CCA, CAA e outros são detectados tanto no soro quanto na urina dos pacientes após a quimioterapia, sendo que na urina a negatização é mais demorada do que no soro.<sup>121-124</sup> Todavia, a avaliação da quimioterapia ainda não foi efetuada com dois ensaios em paralelo para que se obtivessem dados mais sensíveis. A negatização parasitológica ocorre em 3 a 6 meses após um tratamento eficaz, e para os ensaios imunológicos, principalmente aqueles com base na detecção do antígeno parasitário, a negatização ocorre também após 6 meses, podendo, em alguns casos, acontecer mais de 1 ano após o tratamento. Os estudos sugerem que fatores como carga parasitária, período de evolução da doença, sinergismo entre o quimioterápico e anticorpo contra enzima (esterase) de parasito<sup>125</sup> etc. influenciam sobremaneira a eficácia terapêutica, com a negatização do exame imunológico.

### Estudos epidemiológicos por detecção de anticorpos ou antígenos

Os ensaios imunológicos podem auxiliar nos estudos populacionais, para a determinação da prevalência ou incidência da esquistossomose, além de possibilitarem a avaliação



dos programas de controle e vigilância epidemiológica.<sup>50,73,125</sup> Alguns ensaios são mais onerosos, por empregarem antígenos recombinantes, no caso da detecção de anticorpos, ou então anticorpos monoclonais na detecção de antígenos circulantes. Todavia, ensaios imunoenzimáticos, tais como dot-ELISA e fast-dot-ELISA, que detectam antígenos circulantes, sugerem ser práticos para inquéritos populacionais. Por outro lado, o uso da saliva,<sup>126</sup> em vez de soro nos ensaios, poderia contribuir, facilitando estudos populacionais. Ademais, é possível, em termos de probabilidade, transformar os dados obtidos em ensaios imunológicos em dados verdadeiros<sup>50</sup> mediante o uso de uma equação que corrige os resultados encontrados, levando-se em consideração suas características diagnósticas expressas em sensibilidade e especificidade, como segue:

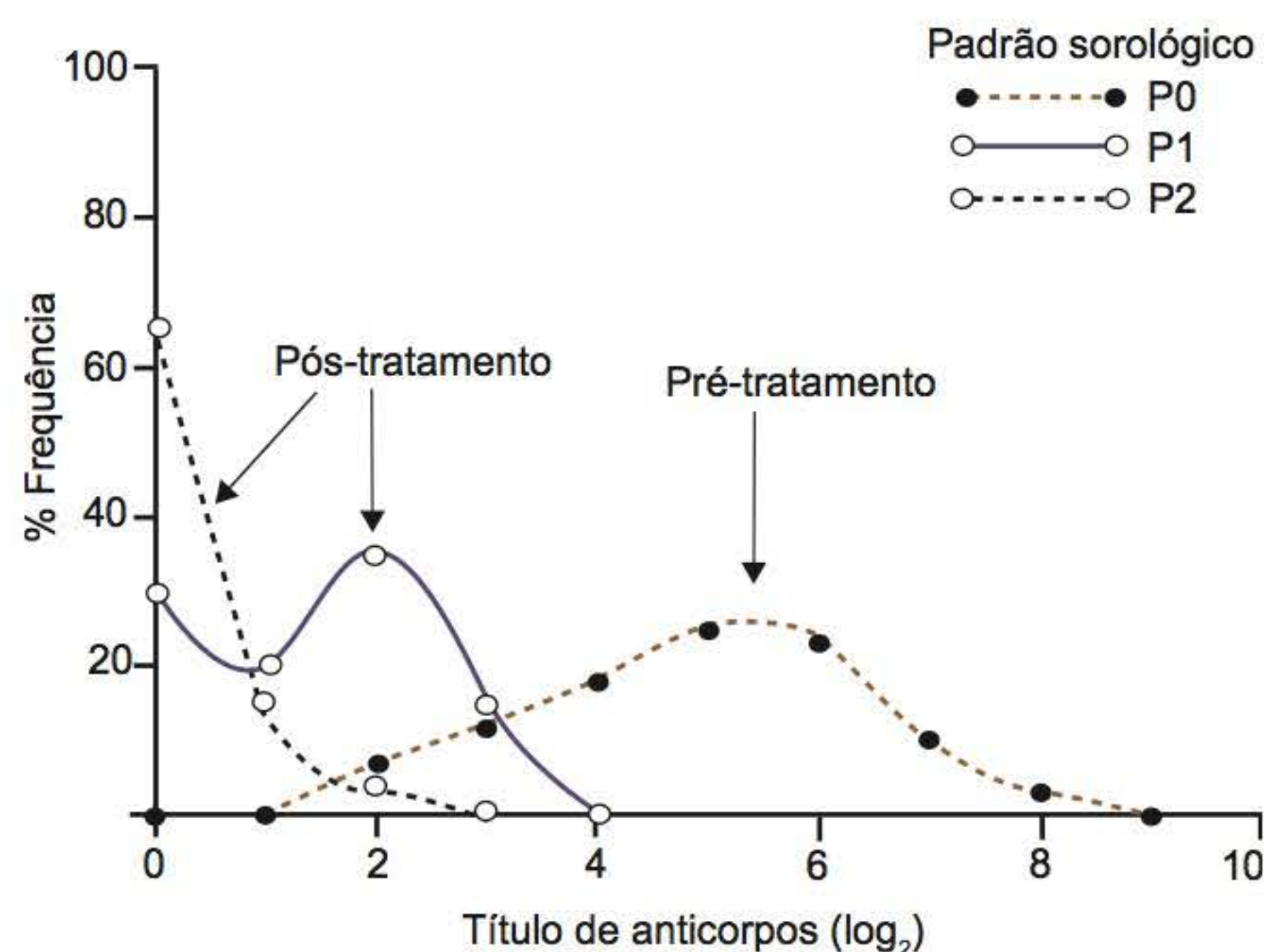
$$\text{Prev V} = \frac{[\text{Pos EI} + \text{Esp} - 1]}{[\text{Sens} + \text{Esp} - 1]}$$

em que Prev V = prevalência verdadeira; Pos = positividade encontrada em um ensaio imunológico (EI); Esp = especificidade de EI; e Sens = sensibilidade de EI.<sup>127</sup>

Em geral, a avaliação imunológica do tratamento em massa nas áreas endêmicas é efetuada com base na queda significativa ou não dos níveis de anticorpos ou antígenos detectados 6 meses após tratamento, semelhantemente ao critério de cura parasitológica, além do grau de soroconversão ocorrido nesse período.<sup>128,129</sup> É possível ainda acompanhar graficamente o perfil da cinética da queda de anticorpos da população submetida ao tratamento, determinando-se a curva de frequência dos níveis de anticorpos, antes e após o tratamento (Figura 27.1).<sup>130</sup> A curva unimodal que corresponde à fase inicial, antes do tratamento, transforma-se em uma curva bimodal, transitória, por causa da queda dos níveis de anticorpos e negatização sorológica, e, finalmente, essa curva torna-se unimodal se o tratamento foi eficaz, semelhante àquela apresentada por um grupo de indivíduos não infectados.

## ► Considerações finais

A pluralidade de testes imunodiagnósticos é decorrente da procura de procedimentos diagnósticos mais sensíveis e específicos, bem como mais práticos e econômicos, que possam



**Figura 27.1** Padrão esperado para a curva de anticorpos específicos na fase antes do tratamento (P0), na fase intermediária (P1), com menos de 6 meses após tratamento, e na fase 6 meses após tratamento (P2) de população com a infecção por *Schistosoma mansoni*.<sup>130</sup>

suprir as limitações do diagnóstico parasitológico. Além disso, a necessidade de discriminar entre infecções ativas e pregressas e de avaliar a maior ou menor morbidade da infecção tem incentivado o desenvolvimento de testes que respondam a esses objetivos.

Portanto, estudos de eficiência de uma série de imunoen-saios (financiados pelo TDR/OMS), incluindo SMP ELISA-SEA (antígeno solúvel de ovos, metaperiodato de sódio-ELISA), MAMA (*Schistosoma mansoni* adulto microssomal antígeno) *Western-blot* e MAMA-FAST, estão sendo realizados em cinco laboratórios de referência regional, para verificar a sensibilidade e especificidade de cada teste contra amostras clínicas parasitologicamente confirmadas. Resultados preliminares atestaram que *Western-blot* com MAMA pode funcionar bem em todos os laboratórios; a especificidade e a sensibilidade dos outros testes variaram de um laboratório para outro.

## ► Referências bibliográficas

1. Amaral RS, Porto MAS. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27 (supl.III):73-89.
2. Pontes LA, Dias Neto A, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. Amer J Trop Med Hyg 2002; 66:652-656.
3. Chieffi PP, Kanamura HY. Diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica. Rev Bras Malar D Trop 1978; 30:77-97.
4. De Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. Parasit Today 1992; 8:274-277.
5. Rabello ALT, Rocha RS, Oliveira JPM *et al*. Stool examination and rectal biopsy in the diagnosis and evaluation of therapy of schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop S Paulo 1992; 34:601-608.
6. Kloetzel K. Splenomegaly in schistosomiasis mansoni. Amer J Trop Med Hyg 1962; 11:472-476.
7. Barbosa FS. Morbidade na esquistossomose. Rev Bras Malar D Trop [número especial] 1967; 3:159.
8. Cheever AW. A quantitative post-mortem study of schistosomiasis mansoni in man. Amer J Trop Med Hyg 1968; 17:38-59.
9. WHO – World Health Organization. Epidemiology and control of schistosomiasis. Technical Report Series 728, Geneva, 1985.
10. Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. Amer J Trop Med Hyg 1996; 54:319-324.
11. Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Intraspecimen fecal egg count variation in *Schistosoma mansoni* infection. Amer J Trop Med Hyg 1997; 57:571-577.
12. Chieffi PP, Marques RM, Siqueira JGV. Avaliação da eficácia do método de Kato-Katz no diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansônica. Rev Inst Adolfo Lutz 1981; 41:23-30.
13. Rabello ALT. Parasitological diagnosis of schistosomiasis mansoni: fecal examination and rectal biopsy. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87 (suppl. IV):325-331.
14. Long EG, McLaren M, Goddard J *et al*. Comparison of ELISA, radioimmunoassay and stool examination for *Schistosoma mansoni* infection. Trans Royal. Soc Trop Med Hyg 1981; 75:365-371.
15. Katz N *et al*. A simple device for quantitative stool tick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop S Paulo 1972; 14:397-400.
16. Zicker F, Katz N, Wolf J. Avaliação do teste de eclosão de miracídeos na esquistossomose mansônica. Rev Inst Med Trop S Paulo 1977; 19:202-207.
17. Chieffi PP, Siqueira JGV, Paschoalotti MA. Estudo sobre o método de eclosão de miracídeos para o diagnóstico da esquistossomose mansônica, em inquéritos epidemiológicos. Rev Bras Malar D Trop 1978; 30:65-75.
18. Silva LC, Christo CH, Lima DMC *et al*. Comparação entre o método de Kato-Katz e eclosão de miracídeos para o diagnóstico da esquistossomose mansônica. In: Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1983, Resumos, p. 6.
19. Lemos CPA, Lima DMC, Silva LC, Chieffi PP. Parasitological diagnosis of schistosomiasis mansoni: concomitant utilization of Kato-Katz method and hatching test. Rev Inst Med Trop S Paulo 1995; 37:471-472.
20. Bell DR. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces with special reference to therapeutic trials. Bull WHO 1963; 29:525-530.



21. Komiya Y, Kobayashi A. Evolution of Kato's tick-smear technique with a cellophane cover for helminth eggs in feces. *Jap J Med Sci Biol* 1966; 19:59-64.
22. Martin LK, Beaver PC. Evaluation of Kato tick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *Amer J Trop Med Hyg* 1968; 17:382-391.
23. Coura JR, Conceição MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Barbosa no diagnóstico coprológico da esquistossomose mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop* 1974; 8:153-158.
24. Teesdale CH, Amin MA. A simple tick-smear technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Bull WHO* 1976; 54:703-705.
25. Chitsulo L, Teesdale CH, Dixon H. Comparison of the Teesdale glass sandwich and Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni*: a double-blind study. *Trop Med Parasitol* 1990; 41:447-449.
26. Coelho PM, Jurberg AD, Oliveira AA, Katz N. Use of saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:720-723.
27. Gomes JF, Hoshino-Shimizu S, Dias LCS *et al.* Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *J Clin Lab Anal* 2004; 18:132-138.
28. Gargioni C, Silva RM, Thomé CM *et al.* Avaliação do kit TF-Test para detecção de ovos de *Schistosoma mansoni*, em amostra fecais provenientes de área de baixa endemicidade para esquistossomose. XIX Congr. Bras. Parasitol., Porto Alegre (RS), Caderno de Resumos, v. 34, p. esp. coprop., 2005.
29. Teixeira CF, Neuhauss E, Bem R *et al.* Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PloS Negl Trop Dis* 2007; 1(2):e73.
30. Lier T, Simonsen GS, Haaheim H *et al.* Novel real-time PCR for detection of *Schistosoma japonicum* in stool. *South Asian J Trop Med Publ Hlth*, 2006; 37:257-264.
31. Gomes LI, Marques LH, Enk MJ *et al.* Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. *PLOS Negl Trop Dis* 2010; 4:1-8.
32. Cançado JR, Cunha AS, Carvalho DG *et al.* Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infection by the quantitative oogram technique. *Bull WHO* 1965; 33:557-566.
33. Kagan IG, Pellegrino J. A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. *Bull WHO* 1961; 25:611-674.
34. Rabello ALT. Diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92:669-676.
35. Pellegrino J. Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni – métodos imunológicos. *Rev Bras Malariol D Trop* 1959; 9:507-551.
36. Warren KS, Lellermeyer RW, Jordan P *et al.* Immunologic diagnosis of schistosomiasis I. A controlled study of intradermal (immediate and delayed) and serologic tests in St. Lucians infected with *Schistosoma mansoni* and uninfected St. Vicentians. *Amer J Trop Med Hyg* 1973; 22:189-199.
37. Hiatt RA, Cline BL, Knight BW. Limitations of the intradermal test for schistosomiasis mansoni. Experience from epidemiologic studies in a Puerto Rican community. *Amer J Trop Med Hyg* 1978; 27:535-541.
38. Oliver-Gonzalez J, Bauman PM, Benenson AS. Species specificity of the anti-egg precipitin in schistosome serums. *J Infect Dis* 1955; 96:95-100.
39. Newsome J. Species-specific serological tests for bilharziasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1958; 52:82-86.
40. Rodrigues-Molina R, Oliver-Gonzalez J, Serrano DG. Studies on immunity to bilharziasis mansoni: evaluation of the circumoval precipitin test. *Bul World Health Organ* 1995; 18:1105-1107.
41. Noya AB, Ruiz R, Lousada S *et al.* Detection of schistosomiasis cases in low-transmission áreas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. *Acta Trop* 2007; 103:41-49.
42. Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Silva LC. A comparison between the hemagglutination test with formalin treated erythrocytes and the immunofluorescence test with worm particles, for schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1970; 12:136-143.
43. Dias LCS, Camargo ME, Hoshino-Shimizu S *et al.* Inquéritos populacionais de esquistossomose mansoni por técnicas sorológicas de imunofluorescência e de hemaglutinação. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1971; 13:37-41.
44. Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Silva LC. Solubilization of antigen of *S. mansoni* adult worms for the passive hemagglutination test. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1981; 23:92-95.
45. Kawazoe U, Hoshino-Shimizu S, Correa NS *et al.* An immunoepidemiological study of schistosomiasis mansoni in Paraíba Valley, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1981; 23:36-40.
46. Van Gool T, Vetter H, Vervoort T *et al.* Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3432-3437.
47. Buck AA, Anderson RI. Validation of the complement fixation and slide flocculation tests for schistosomiasis. *Amer J Trop Med Hyg* 1972; 93:205-214.
48. MacCarten WG, Nzalibe FK, Simonton LA *et al.* Schistosomiasis: Evaluation of the indirect fluorescent antibody, complement fixation and slide flocculation test in screening for schistosomiasis. *Exp Parasitol* 1975; 37:239-250.
49. Hillyer GV, Ruiz-Tiben E, Knight WB *et al.* Immunodiagnosis of infection with *S. mansoni*. Comparison of ELISA, radioimmunoassay and precipitation tests performed with antigens from eggs. *Amer J Trop Med Hyg* 1979; 28:661-669.
50. Hoshino-Shimizu S, Dias LCS, Kanamura HY *et al.* Seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87:303-306.
51. Mott KE, Dixon H. Collaborative study for immunodiagnosis of schistosomiasis. *Bull World Health Org* 1982; 60:729-753.
52. Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Silva LC. Class-specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. *Amer J Trop Med Hyg* 1979; 28:242-248.
53. Silva RM, Silva MIPG, Velloso SA *et al.* Pesquisa de anticorpos IgM contra tubo digestivo do verme para o diagnóstico da esquistossomose mansônica. *Rev Bras Patol Clin* 1992; 28:39-42.
54. Kanamura HY, Dias LCS, Silva RM *et al.* A comparative epidemiologic study of specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings in an endemic area of low transmission of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1998; 40:85-91.
55. Kanamura HY, Dias LCS, Glasser CM *et al.* Detection of IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of the dynamics of schistosomiasis transmission in an endemic area with low worm burden. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1998; 40:225-231.
56. Kanamura HY, Silva RM, Chiodelli SG *et al.* IgM-immunofluorescence test as a diagnostic tool for epidemiologic studies of schistosomiasis in low endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:485-489.
57. Burlandy-Soares LC, Dias LCS, Kanamura HY *et al.* Schistosomiasis mansoni: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 96:853-859.
58. Engvall E, Johnson K, Permann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochem Biophys Acta* 1971; 251: 424-434.
59. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassay for parasitic diseases. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1976; 70:86-106.
60. Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods* 1983; 64:205-214.
61. Snowden K, Hommel M. Antigen detection immunoassay using dipstick-sand colloidal dyes. *J Immunol Methods* 1991; 140:57-65.
62. Rabello ALT, Garcia MMA, Dias Neto E *et al.* Dot-dye-immunoassay and dot-ELISA for the differentiation of acute and chronic schistosomiasis-mansoni using keyhole limpet haemocyanin as antigen. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:279-281.
63. Rabello ALT, Garcia MMA, Gomes PF *et al.* Dye-immunoassay for the diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Serodiag. Immunother. Infect Dis* 1995; 7:3-6.
64. McLaren ML, Draper CC, Roberts JM *et al.* Studies on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72:243-253.
65. Lunde MN, Ottosen EA, Cheever AW. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Amer J Trop Med Hyg* 1979; 28:87-91.
66. Deelder AM, Kornelis D. Immunodiagnosis of recently acquired *S. mansoni* infection: a comparison of various immunological techniques. *Trop Geogr Med* 1981; 33:36-41.
67. Nash TE, Lunde MN, Cheever AW. Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1981; 126:805-810.
68. Deelder AM, Kornelis D. A comparison of IFA and ELISA for the demonstration of antibody against schistosome gut-associated polysaccharide antigen in schistosomiasis. *Z Parasitenkd* 1980; 64:65-75.
69. Oliveira EJ, Kanamura HY, Dias LC *et al.* ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. *Cad Saúde Pub* 2003; 19:255-261.
70. Oliveira EJ, Kanamura HY, Lima DCM *et al.* Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 421-425.
71. Yacoub AAH, Lillywhite JE. The effect of chemotherapy on the serological response of patients with schistosomiasis haematobium infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Fac Med Baghdad* 1985; 27:19-29.



72. Moser D, Doumbo O, Klinkert MQ. The humoral response to heat shock protein 70 in human and murine schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol* 1990; 12:341-342.
73. Ruppel A, Idris MA, Sulaiman SM, Hilali AM. *Schistosoma mansoni* diagnostic antigens (Sm 31/32): a seroepidemiological study in the Sudan. *Trop Med Parasitol* 1990; 41:127-130.
74. Klinkert MQ, Bommert K, Moser D *et al.* Immunological analysis of cloned *Schistosoma mansoni* antigens Sm31 and Sm32 with sera of schistosomiasis patients. *Trop Med Parasitol* 1991; 42:319-324.
75. Raouf EA, Shousha WG, Mahdy El SM, Maklad SS. Serodiagnosis of human intestinal schistosomiasis. *Egypt J Immunol* 2007; 14:55-62.
76. Jemaneh L. Comparison of immunodiagnosis (ELISA) and stool examination (Kato technique) in the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in Ethiopia. *Ethiop Med J* 1993; 31:37-49.
77. Tsang VCW, Tsang KR, Hancock K *et al.* *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. 1. Systematic fraction, quantitation, and characterization of antigenic components. *J Immunol* 1983; 130:1359-1365.
78. Tsang VCW, Hancock K, Kelly MA *et al.* *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. 2. Specificity of antibody responses to the *S. mansoni* microsomal antigen. *J Immunol* 1983; 130:1366-1370.
79. Tsang VCW, Wilkins PP. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Immunol Invest* 1997; 26:175-188.
80. Doenhoff MJA. Vaccine for schistosomiasis: alternative approach. *Parasitol Today* 1998; 14:105-109.
81. Dennis RD, Baumeister S, Lauer G *et al.* Neutral glycolipids of *Schistosoma mansoni* as feasible antigen in the detection of schistosomiasis. *Parasitol* 1996; 112:295-307.
82. Tanabe M, Ozaki M, Kobayashi S, Kaneko NT. Serological studies on schistosomiasis in the Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1990; 32:121-131.
83. Alves-Brito CF, Simpson AJG, Bahia-Oliveira LMG *et al.* Analysis on anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilian supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:53-56.
84. Markl J, Nour, El DM, Winter-Simanowski S *et al.* Specific IgG activity of sera from Egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet haemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften* 1991; 78:30-31.
85. Xue CG, Taylor MG, Bickle QD *et al.* Diagnosis of *Schistosoma haematobium* infection: evaluation of ELISA using a keyhole limpet haemocyanin or soluble egg antigen in comparison with detection of eggs of haematuria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:654-658.
86. Li YS, Ross AGP, He YK *et al.* Serologic diagnosis of *Schistosoma japonicum* infections in China. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:19-21.
87. Mansour MM, Omer-Ali P, Farid Z *et al.* Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet haemocyanin. *Amer J Trop Med Hyg* 1989; 41:338-344.
88. Zheng XF, Wang SP, La WZ *et al.* Studies on the KLH-ELISA and KLH-IHA for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection. *Chinese J Schistosomiasis Control* 1992; 4:57-58.
89. Yeusheng L, Rabello ALT, Simpson AJG *et al.* The differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection. *Chinese J Schistosomiasis Control* 1994; 88:249-251.
90. Auriault C, Gras-Masse H, Pierce RJ *et al.* Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1918-1924.
91. Li Z, King CL, Ogundipe JO *et al.* Preferential recognition by human IgE and IgG4 of a species specific *Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor. *J Infect Dis* 1995; 171:416-422.
92. Xu H, Rekosh DM, Andrews W *et al.* *Schistosoma mansoni* tropomyosin: production and purification of the recombinant protein and its immunodiagnostic potential. *Amer J Trop Med Hyg* 1991; 45:121-131.
93. Grogan J, Rotmans P, Ghonheim H *et al.* Recognition of recombinant *Schistosoma mansoni* cathepsin B and L by human IgG1 and IgG4 antibodies. *Parasite Immunol* 1997; 19:215-220.
94. Ruppel A, Rother U, Vongerichten H *et al.* *Schistosoma mansoni*: immunoblot analysis of adult worm proteins. *Exper Parasitol* 1985; 60:195-206.
95. Klinkert MQ, Felleisen R, Link G *et al.* Primary structures of Sm 31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33:113-122.
96. El-Sayed LH, Ghoneim H, Demian SR *et al.* Diagnostic significance of *Schistosoma mansoni* proteins Sm31 and Sm32 in human schistosomiasis in an endemic area in Egypt. *Trop Med Int Health* 1998; 3:721-727.
97. Oliveira EJ, Kanamura HY, Lima MD *et al.* Application of synthetic peptides in development of a serologic method for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:355-357.
98. Oliveira EJ, Kanamura HY, Takei K *et al.* Synthetic peptides as antigenic base in an enzyme-linked immunosorbent assay for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2008; 102:360-366.
99. Okabe T, Tanaka T. A new urine precipitation reaction for schistosomiasis japonica, a preliminary report. *Kurume Med J* 1958; 5:45-52.
100. Berggren WL, Weller TH. Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animal infected with *Schistosoma mansoni*. *Amer J Trop Med Hyg* 1967; 16:606-612.
101. Nash TE, Lunde MN, Cheever AW. Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1981; 126: 805-810.
102. Deelder AM, Klappe HTM, Van der Aardweg GJM, Van Meerberg EHE. *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. *Exper Parasitol* 1976; 40:189-197.
103. Van Lieshout L, Polderman AM, Deelder AM. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop* 2000; 77:69-80.
104. Li YL, Song WJ, Han JJ *et al.* Detection of *Schistosoma japonicum* antigen (Sj31/32) in sera of Chinese patients using a sandwich ELISA based on a monoclonal antibody. *Trop Med Parasitol* 1994; 91:19-21.
105. Li YL, Idris MA, Corachan M *et al.* Circulating antigens in schistosomiasis: detection of 31/32 kDa proteins in sera from patients infected with *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium* or *S. intercalatum*. *Parasitol Res* 1996; 82:14-18.
106. Sulbarán GS, Ballen DE, Bermúdez H *et al.* Detection of the Sm31 antigen in sera of *Schistosoma mansoni*-infected patients from a low endemic area. *Parasite Immunol* 2010; 32:20-28.
107. Chi F, Carter CE. Detection of a circulating antigen in human schistosomiasis japonicum using a monoclonal antibody. *Amer J Trop Med Hyg* 1990; 42:347-351.
108. Davern KM, Tiu WU, Samaras N *et al.* *Schistosoma japonicum*-monoclonal antibodies to the MR 26,000 schistosome glutathione S-transferase (Sj26) in an assay for circulating antigen in infected individuals. *Exper Parasitol* 1990; 70:293-3034.
109. Berquist NR. Present aspects of immunodiagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87:29-38.
110. Deelder AM, Zeylvar RJM, Fillié YE *et al.* Recognition of gut-associated antigens by immunoglobulin M in the indirect fluorescent antibody test for schistosomiasis mansoni. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:364-367.
111. Gunderson SG, Haagenzen I, Jonassen TO *et al.* Magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J Immunol Methods* 1992; 148:1-8.
112. Van Etten L, Engels D, Krijger FW *et al.* Fluctuation of schistosome antigen levels in urine of individuals with *Schistosoma mansoni* infection in Burundi. *Amer J Trop Med Hyg* 1996; 54:348-351.
113. De Jonge N, Rabello ALT, Krijger FW *et al.* Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991; 85:756-759.
114. Van Lieshout L, Polderman AM, De Vlas SJ *et al.* Analysis of worm burden variation in human *Schistosoma mansoni* infection by determination of serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. *J Infect Dis* 1995; 172:1336-1342.
115. Van Lieshout L, Panday UG, De Jonge N *et al.* Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic area in Surinam by determination of the circulating CAA and CCA. *Acta Trop* 1995; 59:19-29.
116. Silva LC, Hoshino-Shimizu S, Kanamura HY *et al.* Serum antibody changes after chemotherapy of patients with schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1975; 17:344-349.
117. Melo S, Medeiros R, Andrade M *et al.* Correlação entre Kato-Katz e Enzyme-linked immunosorbent assay (Imunoglobulina-G total) em pacientes infectados pelo *Schistosoma mansoni* antes e após o tratamento com Praziquantel. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(Supl.I):179.
118. De Noya BA, Spencer L, Noya O. Pre- and post-treatment immunodiagnostic evaluation in human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(suppl): 271-276.
119. Dunne DW, Hillyer GV, Vazquez G. *Schistosoma mansoni* cationic egg antigen (CF6): Immunoserology with oxamniquine-treated patients and involvement of cf6 in the circumoval precipitin reaction. *Amer J Trop Med Hyg* 1988; 38:508-514.
120. Evengard B, Hammarstrom L, Smith CIE *et al.* Subclass distribution and IgE responses after treatment in human schistosomiasis. *Clin Exper Immunol* 1988; 73:383-388.
121. Rippert C, Apriou M, Tribouley-Duret J *et al.* Effect of a mass treatment with praziquantel on the excretion in urine of a polysaccharide antigen used for diagnosis of schistosomiasis due to *S. mansoni* in Cameroun. *Trop Med Parasitol* 1989; 40:169-171.



122. Barsoum IS, Kamal KA, Bassily S *et al.* Diagnosis of human schistosomiasis by detection of circulating cathodic antigen with a monoclonal antibody. *J Infect Dis* 1991; 164.
123. Hassan MM, Badawi MS, Strand M. Circulating schistosomal antigen in diagnosis and assessment of cure in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. *Amer J Trop Med Hyg* 1992; 46:737-744.
124. Van Lieshout L, De Jonge N, Mansour MM *et al.* Circulating cathodic antigen levels in serum and urine of schistosomiasis patients before and after chemotherapy with praziquantel. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:311-312.
125. Fallon PG, Cooper RD, Probert AJ *et al.* Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitolog* 1992; 105:S41-48.
126. Santos MMAG. Avaliação do uso de saliva e do transudato oral no diagnóstico imunológico da esquistossomose mansoni. Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ), Belo Horizonte (MG), 1997.
127. Gart JJ, Buck, AA. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Amer J Epidemiol* 1966; 83:593-602.
128. De Clerq D, Sacko M, Vercruysse J *et al.* Assessment of cure by detection of circulating antigens in serum and urine, following schistosomiasis mass treatment in two villages of the Office Du Niger, Mali. *Acta Trop* 1997;68:339-346.
129. Rabello ALT, Garcia MMA, Silva RAP *et al.* Humoral immune response in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed-up for two years after treatment. *Clin Infect Dis* 1997; 24:304-308.
130. Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Kimura RT *et al.* Decay of antibody isotypes against early developmental stages of *Schistosoma mansoni* after treatment of schistosomiasis patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39:137-140.



## Capítulo 28

---

# Filariose Bancroftiana

*Gerusa Dreyer e  
José Figuêredo-Silva*

- Introdução, 330
- Correlação clínico-laboratorial, 330
- Diagnóstico da infecção ativa, 333
- Linfocintigrafia, 335
- Referências bibliográficas, 335



## ► Introdução

O termo *filariose linfática* reúne as filarioses brugiana e bancroftiana, ambas causadas por helmintos e transmitidas por mosquitos. A brugiana é a infecção de seres humanos pelas *Brugia malayi* e *B. timori*, encontradas apenas na Ásia, com 20 milhões de infectados. A bancroftose afeta cerca de 100 milhões de pessoas distribuídas em 83 países dos diferentes continentes.<sup>1</sup> A prevalência da infecção aumenta durante a infância, tende a se estabilizar no início da fase adulta e é mais alta entre os indivíduos do sexo masculino e na população entre 20 e 40 anos de idade. A doença de Bancroft, devido às suas apresentações clínicas e complicações, constitui-se em um duro encargo social e econômico inerente aos trópicos e subtropicais da Ásia, da África, do Pacífico Ocidental e de certas regiões das Américas. Embora a infecção seja global, sua distribuição é heterogênea. Aproximadamente um terço dos indivíduos infectados reside na Índia, outro terço na África e o restante, predominantemente, encontra-se na região ocidental do Pacífico e no Sudeste Asiático. As Américas representam 0,3% da prevalência global e o país de maior número de casos é o Haiti, seguido por República Dominicana, Guiana Inglesa e Brasil. Em nosso país, são considerados focos de transmissão ativa a Grande Recife, em Pernambuco,<sup>2</sup> e a cidade de Maceió, em Alagoas.<sup>3</sup> Belém do Pará, que na década de 1950 era a área de maior prevalência, hoje é considerada um foco em extinção.<sup>4</sup> Estima-se a existência de um número global de 40 milhões de pacientes portadores das duas formas mais prevalentes da doença (hidrocele e linfedema). Desse total, cerca de 16 milhões são portadores de linfedema. Somente a Índia é responsável por mais de 7 milhões desses casos.<sup>5</sup>

## ► Correlação clínico-laboratorial

As manifestações clínicas da filariose podem ser causadas tanto pelos vermes adultos como pelas microfilárias. Em residentes de áreas endêmicas, a possibilidade de existência de manifestações clínicas produzidas pela larva infectante (L3) ou pelo seu estágio larval subsequente (L4) é controversa. Enquanto os vermes adultos causam lesão primariamente no vaso linfático e em linfonodos,<sup>6</sup> as microfilárias são imputadas como responsáveis pela produção de manifestações extralinfáticas da filariose bancroftiana.<sup>7</sup>

### ■ Doença linfática

O diagnóstico da doença bancroftiana se baseia, eminentemente, no diagnóstico clínico. Até o momento, não existe nenhum teste marcador de dano linfático de origem filarial. Mais intrigante ainda é o binômio infecção filarial *versus* doença crônica. A possibilidade de microfilaremia é oposta nas duas maiores expressões clínicas da doença: a hidrocele e o linfedema. No primeiro caso, o mapeamento da prevalência de hidrocele em uma determinada área se correlaciona tão positivamente com a prevalência de microfilaremia que é recomendado como um teste rápido de investigação da endemicidade em dada comunidade.<sup>8</sup> Em contrapartida, nos portadores de linfedema, o encontro de infecção ativa é um fenômeno muito raro.<sup>9</sup> Isso é importante para se ponderar a necessidade da investigação de infecção ativa e da indicação do tratamento antifilarial nas condutas propostas em áreas endêmicas pelos serviços que geralmente recebem esses pacientes. Nos por-

tadores de fluido em cavidade vaginal testicular (hidrocele e quilocele), a probabilidade de infecção ativa é alta, e é necessário, como exame de rotina, solicitar a investigação da infecção filarial. Os testes disponíveis atualmente para o diagnóstico de infecção ativa – pesquisa de microfilária em sangue periférico, pesquisa de antígeno circulante de vermes adultos e identificação dos parasitos adultos pela ultrassonografia – não apresentam sensibilidade de 100%, seja isoladamente ou mesmo combinados. Assim, os dados epidemiológicos, como a prevalência da infecção na área da qual o indivíduo é originário, seu tempo de residência na área endêmica e as condições em que vive podem ajudar na interpretação de um ou mais testes negativos e melhor avaliar a necessidade de tratamento antifilarial. Até o momento, o fármaco de escolha inicial para tratamento individual é a dietilcarbamazina (DEC).<sup>\*</sup> Nas áreas endêmicas, espera-se que, na primeira infância, os indivíduos já sejam expostos às larvas infectantes. A linfadenopatia indolor (sem linfedema ipsilateral) parece ser a forma predominante da expressão clínica da doença em crianças e adolescentes.<sup>10</sup> A presença da microfilaremia é variável nessa faixa etária, sendo menos prevalente quanto mais jovem for o paciente. Após a puberdade, o local de predileção dos parasitos adultos passaria a ser os linfáticos intraescrotais, na população masculina, e os linfáticos periféricos dos membros superiores, inferiores e mama, na população feminina.

A ruptura e a consequente fistulização de vasos linfáticos dilatados para dentro de qualquer segmento do trato urinário levam ao extravasamento de linfa, que se junta à urina e produz o que é denominado clinicamente de quilúria. De 80 a 90% da gordura da dieta é absorvida pelos linfáticos lácteos do intestino na forma de quilomícrons, o que confere o aspecto leitoso à linfa e, consequentemente, à urina que contém essas partículas. A quilúria costuma ser classificada como tropical (ou parasitária) e não tropical (ou não parasitária). Normalmente, o termo “tropical” é usado como sinônimo de quilúria determinada pela filariose bancroftiana. A filariose brugiana não compromete o aparelho urogenital. Em áreas endêmicas de bancroftose, alguns pacientes podem ter apenas um episódio de urina leitosa ao longo da vida. O quadro clínico de astenia e perda de peso corporal é justificado pela perda urinária de proteínas, principal responsável pelo estado de debilitação física e que pode chegar a níveis tão altos quanto 40 g nas 24 h. O que se excreta em excesso na urina é, particularmente, fibrinogênio e, em menor proporção, imunoglobulinas. O resultado é a magreza e não o edema generalizado, como ocorre em outras situações em que a albumina é o principal componente da proteinúria, como na síndrome nefrótica. Por outro lado, excepcionalmente, o prejuízo causado pela excreção urinária de imunoglobulinas e de linfócitos é capaz de fazer esses indivíduos sofrerem as consequências de um comprometimento imunológico decorrente desse processo de perda. Na dependência da ingesta hídrica, coágulos de fibrinogênio podem se formar na bexiga, levando a disúria, dificuldade para urinar e, algumas vezes, retenção aguda de urina, em particular nos pacientes do sexo masculino e nos mais idosos, nos quais coexiste a doença obstrutiva pelo crescimento da próstata, em que se faz necessário o cateterismo vesical. A quilúria é acompanhada, sistematicamente, de hematúria micro ou macroscópica, dependendo da importância do sangramento e do

\* A DEC é derivada da piperazina, distribuída no Brasil pela Fundação Nacional de Saúde e fabricada por Farmanguinhos – Fiocruz. É apresentada em comprimidos de 50 mg do sal citratado.



volume de diurese do paciente. Esse sangramento tem origem na ruptura concomitante de vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) da parede do vaso linfático no local da fístula. Quando a quilúria se associa à hematúria macroscópica, é melhor denominada de hematoquilúria. Macroscopicamente, a urina quilosa pode ter aspecto idêntico ao do leite, ser apenas esbranquiçada ou ligeiramente turva, de acordo com a proporção do conteúdo de quilomícrons e de proteínas em relação ao volume da diurese. Em alguns casos, na urina coletada pode ser percebida uma camada mais superficial de gordura. Em outras situações que simulam quilúria, como na piúria e na fosfatúria, a urina pode, também, apresentar-se com uma aparência leitosa ou turva. O diagnóstico diferencial com essas manifestações é feito por meio de observação, por alguns minutos, da urina recém-eliminada em um recipiente transparente. Na urina quilosa, não ocorre a decantação, que permite a formação de um sobrenadante mais límpido, com um aspecto próprio de urina normal, enquanto tanto na piúria como na fosfatúria se identificam, distintamente, um sobrenadante de urina normal e um depósito ou sedimento, geralmente brancacento. O coágulo proteináceo pode ser branco/transparente ou branco/opaco e pode conter hemácias na sua malha de fibrina. Ele pode ser formado, *in vivo*, na bexiga, quando o paciente passa longos períodos sem urinar, devido, em particular, à pequena ingestão de líquidos e, *ex-vivo*, quando a urina quilosa é deixada em repouso. Se a hematúria for macroscópica e intensa, a cor branca ou o aspecto brancacento da urina podem ser mascarados. No entanto, caso não ocorra hemólise importante, poder-se-á visualizar o aspecto que caracteriza a urina quilosa. Independentemente da etiologia, o diagnóstico de quilúria é confirmado pela identificação de linfócitos e não de lipídios, uma vez que a lipidúria pode ter outras etiologias, como a síndrome nefrótica, por exemplo. Vale ressaltar que, conforme o grau de degeneração *ex-vivo* dos linfócitos, estes podem ser confundidos com piócitos e, desse modo, levantar a falsa suspeita de infecção do trato urinário específica (tuberculose renal) ou inespecífica. O sumário de urina, durante o episódio de urina quilosa, tem a sua importância como exame de triagem, uma vez que evidencia hemácias, um grande número de células mononucleares e a constante presença de proteína. Para a confirmação da presença de células mononucleares (linfócitos), deve-se proceder à análise do sedimento urinário de uma amostra recém-coletada, fazendo-se uso de corantes hematológicos. A proteinúria de 24 h é um exame complementar importante não só para dimensionar a perda proteica, mas também para o monitoramento e o balizamento da dieta hipolipídica, uma vez que é mais facilmente quantificável e se correlaciona com a gravidade da fístula. Para mais detalhes clínico-laboratoriais e de tratamento, veja o trabalho de revisão de Dreyer *et al.*<sup>11</sup>

## ▪ Doença extralinfática

### *Eosinofilia pulmonar tropical*

A ligação etiológica entre a infecção filarial e a eosinofilia pulmonar tropical (EPT) foi estabelecida após muitas postulações, com base na similaridade da distribuição geográfica com a filariose, na descoberta de anticorpos antifilariais no soro de pacientes que apresentavam o quadro clínico e, principalmente, na resposta terapêutica ao tratamento antifilarial. Para a suspeita clínica de EPT, o paciente deve:

- Residir em área endêmica por vários anos
- Ser adulto

- Ter sintomas não específicos, tais como astenia, anorexia e perda de peso
- Apresentar eosinofilia periférica acima de 2.000/mm<sup>3</sup>
- Tosse e broncospasmo predominantemente noturnos
- Infiltrado pulmonar, principalmente em bases, evidenciado pela radiografia do tórax.

O diagnóstico é selado com a cura após o uso de DEC. É a única apresentação crônica da doença bancroftiana que induz eosinofilia periférica. A EPT ocorre, particularmente, em pacientes do sexo masculino, não parece existir antes dos 15 anos de idade e acomete apenas uma parcela muito pequena da população infectada com a filária linfática (*Wuchereria* e *Brugia*), com uma prevalência média estimada de 0,01%. Os outros helmintos podem, também, causar uma síndrome pulmonar similar, denominada EPT-like.<sup>12</sup> De modo característico, a pesquisa de microfilária em sangue periférico é, consistentemente, negativa, mesmo quando se analisam volumes maiores de sangue, como de 10 a 20 mL; por isso a EPT também é conhecida como “filariose oculta”. A presença de vermes adultos vivos em vasos linfáticos pode ser identificada pela ultrassonografia em portadores de EPT. Eles produzem as microfilárias que promovem o estímulo que garantirá a cronicidade da síndrome clínica. Os testes de função pulmonar podem revelar padrões obstrutivos, restritivos ou mistos, e o mecanismo do dano pulmonar da doença está ancorado em base autoimune. O antígeno derivado da *Brugia malayi*, chamado Bm2325, é o maior indutor de IgE no hospedeiro. Esse anticorpo específico da classe IgE reage com células epiteliais de pulmão humano. O antígeno filarial é um homólogo total do precursor da  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT), enzima-chave na síntese e na degradação da glutatona. O precursor do alérgeno filarial codifica as subunidades das cadeias pesada e leve e compartilha similaridades estruturais com as enzimas dos mamíferos. O alérgeno Bm2325 foi identificado como um homólogo da subunidade da cadeia leve. Anticorpos murinos contra o recombinante filarial  $\gamma$ -GT reagiram de forma cruzada com a enzima presente nas vias respiratórias humanas. A  $\gamma$ -GT humana é, assim, um alvo para anticorpos presentes no soro de pacientes com EPT.<sup>13</sup> A DEC é o fármaco de escolha e deve ser usada por até 30 dias, na dose de 6 a 12 mg/kg/dia, dividida, geralmente, em 3 ou 4 ingestões diárias. É oportuno ressaltar que essa síndrome pode levar o paciente a óbito pelo desenvolvimento de fibrose intersticial pulmonar. Existindo, assim, dúvidas quanto ao diagnóstico diferencial em relação a outras síndromes pulmonares eosinofílicas, o teste terapêutico com a DEC se faz imperativo. É importante frisar que os corticosteroides proporcionam melhora passageira, com subsequente agravamento do quadro clínico, não estando, assim, indicados.

### *Doença renal*

O dano renal decorrente da filariose se traduz por hematúria e proteinúria, que podem ser observadas em cerca de 33% dos indivíduos microfilarêmicos adultos do sexo masculino que ainda não receberam tratamento específico.<sup>14</sup> A hematúria é, predominantemente, do tipo microscópico e nunca foi identificada em pacientes amicrofilarêmicos. Essa manifestação não guarda, todavia, relação com a densidade dos embriões circulantes. Quando se institui o tratamento antifilarial com a DEC ou a ivermectina (IVE), os indivíduos com doença renal apresentam exacerbação transitória da proteinúria, enquanto a micro-hematúria desaparece, assim como as microfilárias. É interessante observar que muitos dos indivíduos com parasite-



mia, nos quais não se encontram hematúria microscópica nem proteinúria pré-tratamento, quando recebem a medicação antifilarial, apresentam um sumário de urina denunciando, transitoriamente, a presença de hemácias na sedimentoscopia. Nos pacientes com quilúria, essas alterações são, também, encontradas, mas elas têm origem no sistema excretor urinário, como já comentado. Na doença renal, a hematúria e a proteinúria têm como berço o glomérulo renal. A despeito de se imputar a ação direta das microfilárias como responsável pelo dano renal que leva à hematúria, acredita-se que a responsabilidade pela patologia renal se deva à deposição de imunocomplexos na membrana basal glomerular, uma vez que já se detectou glomerulonefrite em pacientes com infecção filarial não bancroftiana. No entanto, apenas em pacientes com oncocercose tem sido determinado formalmente que os antígenos e os imunocomplexos depositados nos rins são de origem filarial. Nos portadores de hematúria filarial, o tratamento de 12 dias deve ser repetido o quanto for necessário, até que se consiga o desaparecimento das microfilárias circulantes. Quando o paciente apresenta vermes adultos não suscetíveis ao tratamento antifilarial e continua produzindo microfilárias, havendo o reaparecimento da hematúria, deve-se lançar mão da associação da DEC com a IVE (6 mg/kg e 400 µg/kg de peso, respectivamente), em dose única. Essa indicação tem como objetivo a melhor ação microfilaricida e, portanto, melhorar a chance de se conseguir o desaparecimento das microfilárias circulantes. No Quadro 28.1 estão listadas as diversas apresentações clínicas da bancroftose e a possibilidade de infecção ativa na população endêmica.

## ■ Complicações e condutas de tratamento

O melhor conhecimento da relação hospede-hospedeiro contribuiu sobremodo para que se revisassem as condutas terapêuticas nas diferentes formas de apresentação clínica dos pacientes que vivem em áreas endêmicas. A modificação terapêutica mais dramática ocorreu entre os pacientes portadores de linfedema, tanto em áreas de *Brugia* quanto nas de *Wuchereria*. Nesses casos, o conhecimento aceito era o de que a doença progrediria inexoravelmente, uma vez que dependeria da resposta imunológica do hospedeiro ao parasito, e muito pouco ou nada poderia ser feito pelo paciente. Observou-se, entretanto, que o substrato anatomopatológico da doença causada pela filariose linfática – a linfangiectasia não obstrutiva<sup>6,15</sup> – poderia predispor a uma disfunção linfática que induziria maior suscetibilidade à presença de lesões interdigitais nos membros afetados, aumentando o risco de infecções bacterianas secundárias. Esse processo infeccioso/inflamatório agudo bacteriano, erisipela-símile, conhecido como dermatolinfangioadenite aguda ou DLAA,<sup>16</sup> independentemente da presença de infecção ativa filarial, levaria a maior disfunção do sistema linfático local, formando-se, assim, um círculo vicioso: linfangiectasia, disfunção linfática, predisposição a infecções bacterianas agudas que, por sua vez, produziram mais lesão linfática. Quanto maior a lesão linfática (*i. e.*, a gravidade do linfedema), maior a probabilidade de novos episódios agudos bacterianos, e assim sucessivamente. Dessa forma, sob a perspectiva do que foi descrito até o momento, o “linfedema

**Quadro 28.1 ■ Probabilidade de infecção ativa, de acordo com as diversas apresentações clínicas da doença, tratamento antifilarial recomendado e outros procedimentos sugeridos.**

Manifestação clínica	Probabilidade de infecção ativa	Tratamento recomendado			
		DEC	IVE	Educação e aconselhamento	Outros procedimentos gerais/medicamentos
Assintomáticos ou não					
Microfilarêmicos	100%	6 mg/kg/dia/ dose única ou 12 dias	NR	Sim	Ultrassom de bolsa escrotal para determinar a eficácia do tratamento contra os vermes adultos
Amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos	100%	6 mg/kg dose única	NR	Sim	Ultrassom de bolsa escrotal para determinar a eficácia do tratamento contra os vermes adultos
Microfilarêmicos com hematúria					
	100%	12 dias	Sim	Sim	Pesquisa regular de microfilárias circulantes (a cada 3 ou 6 meses)
Episódios agudos					
LFA	100%	Após episódio agudo/ dose única	NR	Sim	Compressas frias, repouso
DLAA	Muito baixa	Se infectado	NR	Sim	Compressas frias, analgésicos, antipiréticos, antibióticos e antifúngicos tópicos, antibióticos sistêmicos, drenagem postural, repouso, higiene
Manifestações crônicas					
Linfedema	Muito baixa	Se infectado	NR	Sim	Higiene diária, antibióticos e antifúngicos tópicos, exercícios, antibiótico sistêmico profilático em casos muito avançados
Linfangiomatose	Variável	Se infectado	NR	Sim	Higiene, antibióticos tópicos, sistêmicos (curativo ou profilático), cirurgia reconstrutora
Hidrocele	Alta	Se infectado	NR	Sim	Cirurgia
Quilosele	Alta	Se infectado	NR	Sim	Cirurgia
Quilúria	Variável	Se infectado	NR	Sim	Dieta hipolipídica/hiperproteica, hidratação, repouso relativo, cateterização vesical
Adenopatia	Variável	Se infectado	NR	Sim	Higiene do membro ipsilateral
EPT	100%	12 a 30 dias	NR	Sim	Broncodilatadores, repouso

NR = não recomendado; LFA = linfangite filarial aguda (causada pela morte do verme adulto); DLAA = dermatolinfangioadenite aguda (infecção cutânea bacteriana com adenopatia satélite); DEC = dietilcarbamazina; IVE = ivermectina.



filarial”, na realidade, é considerado uma complicação dos episódios agudos bacterianos apresentados pelos pacientes. Portanto, o portador de linfedema “de provável etiologia filarial” deve ser, então, conduzido com o mesmo protocolo geral utilizado para o portador de linfedema de outras etiologias, centrado, em especial, para a prevenção dos episódios agudos bacterianos de repetição. Por outro lado, o tratamento antifilarial não tem qualquer eficácia no vaso linfático já danificado e consequentemente no linfedema em si, mesmo que o paciente tenha sido portador de vermes adultos de localização ipsilateral (G. Dreyer, comunicação pessoal) no passado.<sup>17</sup> As bases do programa de morbidade e o detalhamento do manejo clínico de pacientes portadores de linfedema em áreas endêmicas podem ser encontrados na literatura<sup>18,19</sup> e nos vídeos educativos disponibilizados no *website* [www.amaurycoutinho.org.br](http://www.amaurycoutinho.org.br).

## ► Diagnóstico da infecção ativa

### ▪ Pesquisa e quantificação de microfilárias

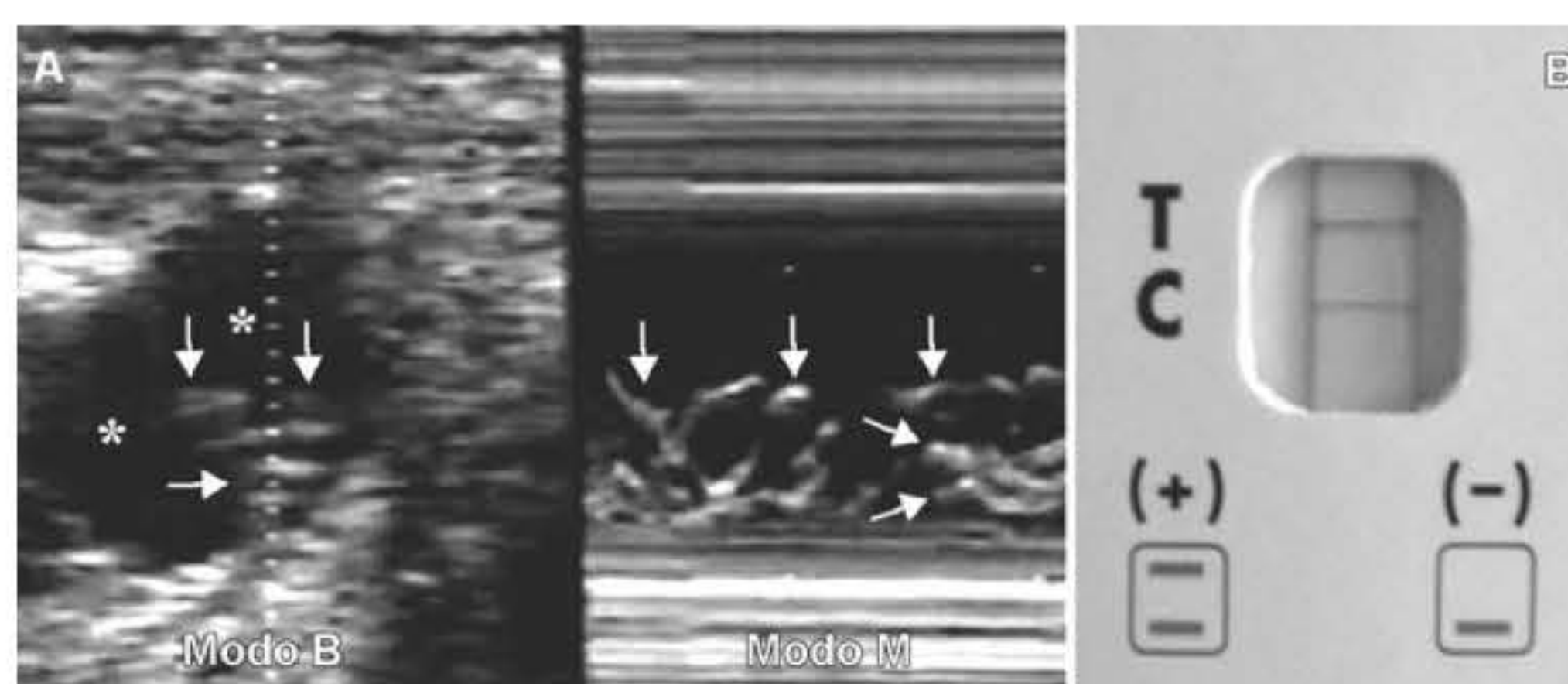
O diagnóstico parasitológico clássico é feito pela pesquisa da microfilária (Mf) em sangue periférico. A forma mais difundida é o método da gota espessa com utilização de sangue capilar, geralmente em volumes de 20, 40 ou 60 mL. Esse ainda é o método de escolha para inquéritos hemoscópicos e triagem individual. É importante lembrar que o sangue capilar contém 1,25 vez mais microfilárias do que o sangue venoso.<sup>20</sup> A partir de 100 e 60 Mf por mL, densidade estimada por filtração em membrana, existe 100% de sensibilidade da gota espessa, usando-se 20 mL e 60 mL de sangue capilar, respectivamente. Entretanto, essa sensibilidade cai para 26% e 52%, se o nível de parasitemia estiver entre 1 e 30 Mf/mL, usando-se 20 e 60 mL, respectivamente.<sup>20</sup> Outras metodologias também podem ser empregadas usando-se sangue capilar; são menos práticas e até mais caras em algumas situações, e apresentam, entretanto, a mesma sensibilidade da gota espessa, como, por exemplo, o exame a fresco, a contagem em câmara e a técnica em tubo de micro-hematócrito. As técnicas de concentração, por sua vez, utilizam maiores volumes de sangue venoso, sendo este de origem venosa, aumentando-se em muito a sensibilidade. São recomendadas para indivíduos com suspeita de baixa densidade de parasitemia, assim como após o tratamento, quando o número de microfilárias diminui significativamente. A técnica de concentração descrita por Knott<sup>21</sup> foi a primeira a ser empregada, sendo hoje substituída pela filtração em membrana

de policarbonato. A estimativa da densidade de Mf circulantes pode ser feita por qualquer técnica em que o volume de sangue examinado seja mensurado. Vale salientar que a pesquisa de microfilária da *W. bancrofti* deve seguir o horário de periodicidade das microfilárias em sangue periférico que, na maioria das áreas endêmicas, é noturno e tem o seu pico de densidade entre 23 h e 1 h. Dependendo da região endêmica de onde o paciente proceda, pode haver a necessidade de distinguir a *W. bancrofti* de outras espécies que apresentam bainha, tais como *Loa loa* (África), *Mansonella perstans* (Américas, África) e *Mansonella ozzardi* (Américas Central e do Sul). O critério de amicrofilaremia varia de estudo para estudo e está na dependência da técnica empregada. Até o momento, o maior volume de sangue utilizado para se definir o estado de amicrofilaremia em um grupo de pacientes foi relatado por Rocha *et al.* em 1996,<sup>22</sup> que avaliaram o teste de Og4C3 (pesquisa de antígeno circulante por ELISA) ao usarem 16 mL de sangue venoso. Mf podem também ser observadas ocasionalmente em sangue menstrual, no exame ginecológico de citologia oncológica, líquido hidrocelico/quilocelico, urina e aspirado de medula óssea. Entretanto, a pesquisa de Mf para fins diagnósticos deve sempre ser sempre feita em sangue periférico.

### ▪ Pesquisa de vermes adultos

#### Ultrassonografia

A partir de 1994, tornou-se possível visualizar vermes adultos vivos de *W. bancrofti* pela ultrassonografia de vasos linfáticos (principalmente os de localização intraescrotal)<sup>23,24</sup> e de linfonodos.<sup>25</sup> Por meio do exame ultrassonográfico, os parasitos adultos aparecem em movimentos aleatórios e contínuos, conhecidos como o sinal da dança da filária (SDF) (Figura 28.1A). Vale salientar que o SDF pode ser visto a qualquer hora do dia, e não mantém paralelo com a periodicidade noturna das microfilárias. É particularmente útil na identificação da infecção ativa nos amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos.<sup>26</sup> O exame é também capaz de identificar a dilatação linfática subclínica,<sup>27</sup> além de permitir o acompanhamento da progressão da dilatação linfática, enquanto os vermes adultos permanecem vivos.<sup>28</sup> O uso da ultrassonografia, combinada com o exame físico de forma seriada, após o tratamento antifilarial, é de particular importância nos estudos em que se busca avaliar a eficácia de substâncias macrofilaricidas.<sup>29,30</sup> A ultrassonografia é um exame não invasivo, altamente sensível em indivíduos jovens do sexo masculino<sup>22</sup> e potencialmente possível de ser realizado na maioria das áreas endêmicas.



**Figura 28.1** A. Ultrassonografia do conteúdo escrotal com sonda de 7,5 MHz. Em modo B, vaso linfático dilatado (\*) contendo pontos e segmentos lineares ecogênicos no interior de seu lúmen (setas). Em tempo real, as estruturas ecogênicas mostram movimento ativo peculiar chamado de sinal da dança da filária (SDF), o que corresponde à presença de vermes adultos vivos de *W. bancrofti* no interior de vasos linfáticos; em modo M, visualiza-se o registro gráfico do SDF (setas). B. Teste imunocromatográfico positivo – ICT card – feito com sangue capilar de um paciente amicrofilarêmico e SDF-positivo.



### Exame clínico

O efeito macrofilaricida da DEC também pode ser utilizado no diagnóstico de infecção ativa, principalmente em população jovem masculina, por meio da incidência de nódulos (*granulomas filariais*) intraescrotais detectados pelo exame físico urológico, mesmo após dose única de 6 mg/kg. O “teste terapêutico” com a DEC está indicado para indivíduos que, apesar de viverem em áreas de bancroftose de média/alta transmissibilidade, apresentam-se negativos nos testes para pesquisa de microfilaremia (filtração em membrana de polycarbonato) e de vermes adultos (ultrassonografia e antígeno circulante). Trabalho recentemente publicado relatou que nódulos intraescrotais detectados ao exame físico, após o tratamento com a DEC e posteriormente biopsiados, apresentaram granuloma filarial em 100% dos casos estudados.<sup>31</sup> Esse teste é particularmente atrativo em pesquisa clínica para se selecionarem indivíduos chamados de endêmicos normais, negativos para infecção ativa nos testes laboratoriais e de imagem. Por outro lado, o teste terapêutico com a DEC está contraindicado em áreas onde exista a coendemicidade com a *Loa loa* ou a *Onchocerca volvulus*.

### Imunodiagnóstico

► **Pesquisa de antígeno circulante.** O primeiro teste comercialmente disponível para detectar antígenos solúveis de *W. bancrofti* em soro foi um *ELISA sanduíche* (quantitativo), produzido pela JCU Tropical Biotechnology. Para a captura, é usado um anticorpo monoclonal, Og4C3, inicialmente gerado a partir de *Onchocerca gibsoni*. A sensibilidade desse teste, quando se usa a filtração em membrana como teste-ouro, é de 100%, de acordo com Lammie *et al.*<sup>32</sup> Segundo Chanteau *et al.*,<sup>33</sup> entretanto, essa sensibilidade é de 75% e 100% para densidades de microfilárias menores que 50/ml e maiores que 50/ml, respectivamente. Rocha *et al.*<sup>22</sup> evidenciaram que, em indivíduos com menos de 1 Mf/ml e nos amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos, as sensibilidades são de 72,2% e 66,7%, respectivamente. Assim, a sensibilidade do teste varia de acordo com a condição parasitológica dos indivíduos. Outro exame comercialmente disponível, *W. bancrofti*-específico, é o teste imunocromatográfico (qualitativo), desenvolvido pela ICT Diagnostic e, atualmente, fabricado pela Binax Inc. Esse teste utiliza cerca de 100 µl de sangue total (capilar ou venoso), plasma ou soro. O cartão contém anticorpos antifilária ligados ao ouro coloidal. Desse modo, reage com o antígeno do espécime investigado e acumula-se, formando uma linha visível (T); uma outra linha com IgG anti-humano também presente no cartão serve como controle (C) (Figura 28.1B). Recentemente, a sensibilidade do *ICT card* foi avaliada e variou de 52 a 100%, quando os pacientes foram agrupados por critérios diferentes (idade, sexo, presença ou ausência de vermes adultos detectados pela ultrassonografia, microfilaremia positiva/negativa e densidade de microfilárias circulantes).<sup>34</sup> Ambos os testes – Og4C3 e ICT – podem ser realizados, indiferentemente, nos períodos diurno e noturno. Como não se conhece, até o momento, a cinética do desaparecimento do antígeno após um tratamento antifilarial bem-sucedido e os testes não apresentam sensibilidade de 100%, fica difícil a interpretação de um teste negativo para assegurar a cura parasitológica de um dado paciente. Isso é ainda mais relevante para o *ICT card*, uma vez que é um teste qualitativo.

► **Pesquisa de anticorpo circulante.** A pesquisa e a quantificação por ELISA de anticorpos antifilariais das classes IgG e IgG4, quando usadas isoladamente, não parecem traduzir

infecção ativa. Em futuro próximo, os estudos sobre os anticorpos circulantes poderão ser utilizados em populações sentinelas, como ferramentas para ajudar na certificação de interrupção da transmissão após programas de controle por tratamento antifilarial em massa.

### Diagnóstico molecular

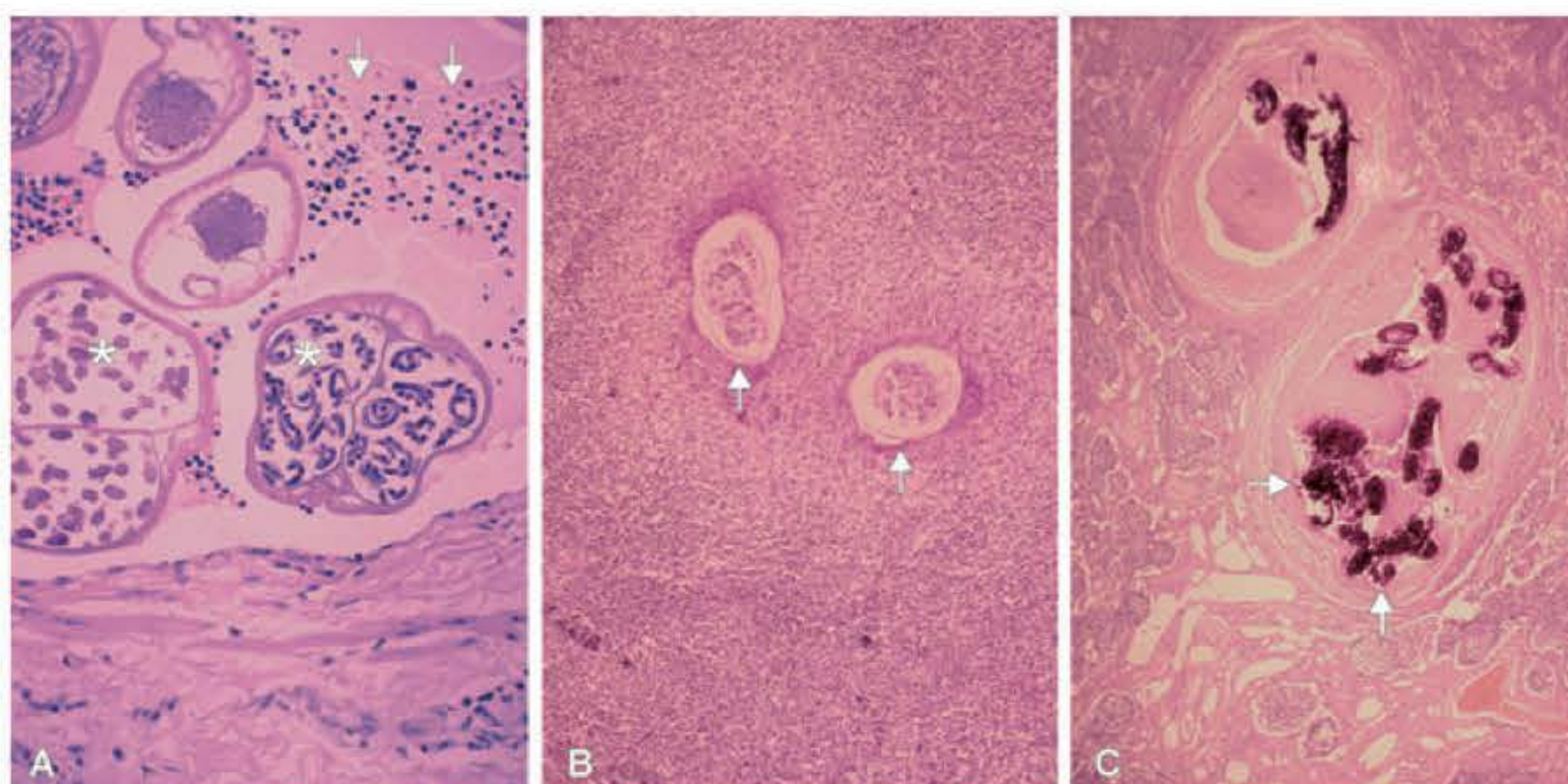
Nos últimos dez anos, várias reações em cadeia da polimerase (PCR) têm sido descritas, possibilitando a detecção espécie-específica de DNA de *Brugia* e de *Wuchereria*. Inicialmente, a utilização da PCR era feita de modo satisfatório apenas quando a amostra de sangue era coletada no período noturno. A sensibilidade desse teste, entretanto, aumentou com a utilização de sondas modificadas, direcionadas às sequências repetitivas de DNA, tais como *repeat SspI*,<sup>35</sup> ou à sequência inteira – *AccI*.<sup>36</sup> Assim, a detecção de DNA de *W. bancrofti* em amostras de sangue coletadas no período diurno tornou-se possível com uma sensibilidade de 93%, quando comparada com gota espessa,<sup>35</sup> ou de 94%, se comparada com filtração (de 1 ml de sangue) em membrana.<sup>36</sup> Ambos os estudos relatam que, a partir da PCR, é possível identificar DNA do parasito em indivíduos amicrofilarêmicos. No entanto, um estudo que compara os métodos parasitológicos de PCR, Og4C3, ELISA e ultrassonografia revelou que a PCR não foi capaz de detectar DNA em amicrofilarêmicos antígeno-positivos e em indivíduos amicrofilarêmicos, mas portadores de vermes adultos.<sup>37</sup>

### Diagnóstico histopatológico

#### Histopatologia

Em áreas endêmicas, as alterações histológicas no sistema linfático são associadas à presença dos vermes adultos e variam de acordo com a viabilidade parasitária.<sup>15</sup> Enquanto os parasitos – que são facilmente identificáveis em cortes histológicos de rotina – estão vivos, a alteração fundamental é a linfangiectasia sem atividade inflamatória na parede do vaso linfático (Figura 28.2A). A morte parasitária desencadeia um processo inflamatório localizado, com formação de nódulos ao longo dos tratos linfáticos – os assim chamados *granulomas filariais*, que se desenvolvem nas localizações preferenciais dos vermes adultos (já mencionadas anteriormente). Histologicamente, os parasitos mostram diferentes estágios de desintegração e são envolvidos por reação granulomatosa (Figura 28.2B), cuja evolução tende para a reabsorção dos restos parasitários, a diminuição do granuloma (retração, modulação) com fibrose e a remodelagem vascular. Calcificação dos vermes, mas não da parede vascular, é frequente (Figura 28.2C). Em áreas endêmicas, o exame histopatológico não é, a rigor, parte da rotina diagnóstica da filariose linfática, sobretudo após o advento da validação da ultrassonografia como um método diagnóstico não invasivo.<sup>25</sup> Biopsias de linfonodos nessa faixa etária são feitas tendo como principal suspeita lesões neoplásicas e condições inflamatórias, como a tuberculose linfonodal, sendo o diagnóstico histopatológico de adenopatia filarial quase sempre inesperado.<sup>10</sup> A filariose bancroftiana, no entanto, deve ser incluída no diagnóstico clínico diferencial das adenopatias em crianças e adolescentes. Diferentemente de linfonodos, a biopsia de nódulos desenvolvidos nos linfáticos intraescrotais pode ser incorporada à rotina diagnóstica, desde que não exista contraindicação médica para o procedimento. Na verdade, esses nódulos são considerados marcadores de infecção filarial recente em adultos jovens originários de áreas endêmicas,<sup>31</sup> e a biopsia é uma ferramenta importante na avaliação da eficácia de substâncias macrofilaricidas.<sup>15,28–30,34</sup>





**Figura 28.2** **A.** Cortes transversais de vermes adultos de *W. bancrofti* aparentemente íntegros de ambos os sexos, com fêmea(s) grávida(s) contendo embriões e microfilárias intrauterinas (\*). O vaso linfático mostra-se dilatado, mas sem reação inflamatória parietal. Os linfócitos vistos no lúmen são componentes normais da linfa (setas). H.E. 400x. **B.** Resposta inflamatória granulomatosa em torno de vermes adultos com evidências de degeneração (setas); material corresponde a nódulo intraescrotal removido cirurgicamente de paciente submetido ao tratamento com dietilcarbamazina. H.E. 40x. **C.** Granulomas filariais antigos fibróticos contendo restos parasitários calcificados (setas); note a ausência de calcificação na parede do vaso linfático. H.E. 40x.

### Citologia

O exame citológico de material obtido por punção aspirativa por agulha fina pode ser útil também no diagnóstico da infecção filarial.<sup>38</sup> Em material colhido de linfonodos, mama, nódulos subcutâneos, ou de outras fontes, microfilárias ou mesmo vermes adultos<sup>39</sup> podem ser detectados. É um método de realização relativamente rápido e de baixo custo, que ganha importância, sobretudo, no diagnóstico diferencial das neoplasias benignas e malignas da mama.

## ► Linfocintigrafia

Desde 1960, vários estudos usando linfangiografia detalharam as anormalidades em linfáticos de membros inferiores de pacientes com linfedema vivendo em áreas endêmicas de filariose linfática. Essas anormalidades incluíam linfangiectasia, obstrução linfática, com formação de colaterais, refluxo dérmico e defeito de enchimento nos linfonodos correspondentes às áreas de drenagem. Estudos subsequentes com linfocintigrafia também mostraram anormalidades semelhantes.<sup>40,41</sup> Nessa época, a linfocintigrafia já sugeria existir uma fase subclínica da doença causada pela *W. bancrofti*, que foi posteriormente confirmada pela ultrassonografia, ao se explorarem os linfáticos intraescrotaes de indivíduos amicrofilarêmicos e sem linfedema em membros inferiores.<sup>27</sup> Por outro lado, os linfáticos de membros inferiores (MMII) de indivíduos assintomáticos portadores de vermes adultos vivos de *W. bancrofti* em linfáticos intraescrotaes, investigados pela linfocintigrafia, revelaram muitas anormalidades. Quando os resultados foram analisados, parecia haver uma discrepância entre as importantes anormalidades reveladas pela linfocintigrafia de MMII (linfáticos distais de perna e de coxa) e o sítio preferencial dos vermes adultos na população masculina – os linfáticos intraescrotaes.<sup>24</sup> Ficou a dúvida: as anormalidades detectadas em MMII seriam de etiologia filarial? Para resolver essa intrigante observação, Marchetti *et al.*, em 1998,<sup>42</sup> conduziram um estudo comparando indivíduos assintomáticos do sexo masculino, infectados com vermes adultos de *W. bancrofti* em linfáticos intraescrotaes, e indivíduos de área não endêmica, pareados

por idade (20 e 21 anos), situação socioeconômica e atividade física. Para surpresa, segundo os critérios de normalidade publicados por Nawaz *et al.* (1985) e Weissleder e Weissleder (1988),<sup>43,44</sup> somente um voluntário da área não endêmica, entre os 15 examinados, preencheu o critério de normalidade. O padrão e a extensão das anormalidades linfáticas subclínicas dos indivíduos de área não endêmica foram similares àqueles encontrados nos pacientes infectados com a *Wuchereria*. Esses achados dão embasamento para se acreditar que, em indivíduos do sexo masculino infectados com *W. bancrofti*, condições outras, e não a bancroftose, seriam as responsáveis pelas “anormalidades” em MMII detectadas nessa população. Assim, esse estudo sugere fortemente que a linfocintigrafia não parece evidenciar anormalidades patognômicas de filariose, assim como não identifica ou localiza o verme adulto filarial vivo ou morto. Desse modo, não se mostra útil para o diagnóstico etiológico das complicações causadas pela *W. bancrofti*. No entanto, é importante na avaliação funcional e morfológica do sistema linfático superficial e profundo dos pacientes portadores de linfedema vivendo em áreas endêmicas de filariose.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio logístico e financeiro da organização não governamental Amaury Coutinho para Doenças Endêmicas e Tropicais ([www.amaurycoutinho.org.br](http://www.amaurycoutinho.org.br)) na produção deste capítulo.

## ► Referências bibliográficas

1. WHO – World Health Organization. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80:202-212.
2. Medeiros Z, Dreyer G, Andrade L *et al.* *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural *Culex* infectivity rates in northeast Brazil. J Trop Med Hyg 1992; 95:214-217.
3. Fontes G, Rocha EMM, Brito AC *et al.* Lymphatic filariasis in Brazilian urban area (Maceió, Alagoas). Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93:705-710.
4. Fontes G, Braun RF, Fraiha Neto H *et al.* Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38:131-136.
5. Ramaiah KD, Das PK, Edwin M *et al.* The economic burden of lymphatic filariasis in India. Parasitol Today 2000; 16:251-253.



6. Dreyer G, Norões J, Figueredo-Silva J *et al.* Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: a clinical perspective. *Parasitol Today* 2000; 16:544-548.
7. Dreyer G, Dreyer P, Piessens WF. Extralymphatic disease due to bancroftian filariasis. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:1467-1472.
8. Gyapong JO, Webber RH, Morris J *et al.* Prevalence of hydrocele as a rapid diagnostic index for lymphatic filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:40-43.
9. Addiss DG, Eberhard ML, Lammie PJ. "Filarial" adenolymphangitis without filarial infection. *Lancet* 1994; 343:597.
10. Figueredo-Silva J, Dreyer G. Bancroftian filariasis in children and adolescents: clinical pathological observations in 22 cases from an endemic area. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99:759-769.
11. Dreyer G, Mattos D, Norões J. Quilúria. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53:460-464.
12. Rocha A, Dreyer G, Poindexter RW *et al.* Syndrome resembling tropical eosinophilia but of non-filarial aetiology: serologic findings with filarial antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89:573-575.
13. Lobos E, Nutman TB, Hothersall JS *et al.* Elevated immunoglobulin E against recombinant *Brugia malayi*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in patients with bancroftian filariasis: association with tropical pulmonary eosinophilia or putative immunity. *Infect Immun* 2003; 71:747-753.
14. Dreyer G, Ottesen EA, Galdino E *et al.* Renal abnormalities in microfilaremic patients with bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:745-751.
15. Figueredo-Silva J, Norões J, Cedenho A *et al.* The histopathology of bancroftian filariasis revisited: the role of the adult worm in the lymphatic-vessel disease. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96:531-541.
16. Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G *et al.* Bacteriologic studies of skin, tissue fluid, lymph, and lymph nodes in patients with filarial lymphedema. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:7-15.
17. Freedman DO, Bui T, De Almeida Filho PJ *et al.* Lymphoscintigraphic assessment of the effect of diethylcarbamazine treatment on lymphatic damage in human bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52:258-261.
18. Dreyer G, Dreyer P. Bases para o tratamento da morbidade em áreas endêmicas de filariose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33:217-221.
19. Dreyer G, Addiss D, Dreyer P *et al.* Basic lymphoedema management: treatment and prevention of problems associated with lymphatic filariasis. Hollis, NH: Hollis Publishing Co. 2002; 112 pp.
20. Dreyer G, Pimentel A, Medeiros Z *et al.* Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife, Brazil. *Trop Med Int Health* 1996; 1:264-272.
21. Knott J. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1939; 32:191-196.
22. Rocha A, Addiss D, Ribeiro ME *et al.* Evaluation of the Og4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: infected persons with undetectable or ultralow microfilarial densities. *Trop Med Int Health* 1996; 1:859-864.
23. Amaral F, Dreyer G, Figueredo-Silva J *et al.* Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:753-757.
24. Norões J, Addiss D, Amaral F *et al.* Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:55-56.
25. Dreyer G, Figueredo-Silva J, Carvalho K *et al.* Lymphatic filariasis in children: adenopathy and its evolution in two young girls. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:204-207.
26. Dreyer G, Santos A, Norões J *et al.* Amicrofilaraemic carriers of adult *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:288-289.
27. Norões J, Addiss D, Santos A *et al.* Ultrasonographic evidence of abnormal lymphatic vessels in young men with adult *Wuchereria bancrofti* infection in the scrotal area. *J Urol* 1996; 156:409-412.
28. Dreyer G, Addiss D, Roberts J *et al.* Progression of lymphatic vessel dilatation in the presence of living adult *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:157-161.
29. Dreyer G, Addiss D, Norões J *et al.* Ultrasonographic assessment of the adulticidal efficacy of repeated high-dose ivermectin in bancroftian filariasis. *Trop Med Int Health* 1996; 1:427-432.
30. Norões J, Dreyer G, Santos A *et al.* Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* in vivo. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:78-81.
31. Norões J, Figueredo-Silva J, Dreyer G. Intrascrotal nodules in adult men as a marker for filarial granuloma in a bancroftian filariasis-endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 317-321.
32. Lammie PJ, Hightower AW, Eberhard ML. Age-specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti*-exposed population. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:348-355.
33. Chanteau S, Moulia-Pelat JP, Glaziou P *et al.* Og4C3 circulating antigen: a marker of infection and adult worm burden in *Wuchereria bancrofti* filariasis. *J Infect Dis* 1994; 170:247-250.
34. Dreyer G, Lins R, Norões J *et al.* Sensitivity of the Immunochromatographic test relative to detection of adult *Wuchereria bancrofti* worms by ultrasound. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78:28-34.
35. Lucena WA, Dhalia R, Abath FGC *et al.* Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaraemic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:290-293.
36. Abbasi I, Githure J, Ochola JJ *et al.* Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. *Parasitol Res* 1999; 85:844-849.
37. Dissanayake S, Rocha A, Norões J *et al.* Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of infection in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:526-530.
38. Yenkeswar PN, Kumbhalkar DT, Bobhate SK. Microfilariae in fine needle aspirates: a report of 22 cases. *Indian J Pathol Microbiol* 2006; 49:365-369.
39. Kumar V, Gupta N, Srinivasan R *et al.* Gravid adult filarial worm in fine needle breast aspirate masquerading as carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 2004; 47:597.
40. Freedman DO, Almeida Filho PJ, Besh S *et al.* Lymphoscintigraphic analysis of lymphatic abnormalities in symptomatic and asymptomatic human filariasis. *J Infect Dis* 1994; 170:927-933.
41. Witte MH, Jamal S, Williams WH *et al.* Lymphatic abnormalities in human filariasis as depicted by lymphangioscintigraphy. *Arch Intern Med* 1993; 153:737-744.
42. Marchetti F, Piessens FW, Medeiros Z *et al.* Abnormalities of the leg lymphatics are not specific for bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:650-652.
43. Nawaz K, Hamad M, Sadek S *et al.* Lymphoscintigraphy in peripheral lymphedema using technetium-labelled human serum albumin: normal and abnormal patterns. *Lymphology* 1985; 18:181-186.
44. Weissleder H, Weissleder R. Lymphedema: evaluation of qualitative and quantitative lymphoscintigraphy in 238 patients. *Radiology* 1988; 167:729-735.



## Capítulo 29

---

# Hidatidose

*Paulo Jaconi Saraiva e  
Alexandre M. Fuentefria*

- Introdução, 338
- Etiologia, 338
- Epidemiologia, 339
- Diagnóstico, 340
- Bibliografia, 345



## ► Introdução

A aplicação de métodos laboratoriais distintos *in vitro* e a detecção da infecção por procedimentos com imagens são hoje utilizados nas diferentes situações clínicas e soropidemiológicas para o diagnóstico da hidatidose humana causada por *Echinococcus granulosus*.

Deste modo, o assunto precisa ser abordado multidisciplinarmente, reunindo a informação frequentemente dispersa sobre os aspectos da biologia, clínica, imunologia e imagens do parasito que intervêm no diagnóstico da enfermidade.

A equinococose ou hidatidose é a doença causada pela forma larvária do *Echinococcus granulosus*, o qual, no seu processo de desenvolvimento, produz a formação do cisto hidático, um conjunto de alto poder antigênico.

O verme adulto é um pequeno cestódeo encontrado no intestino do cão e de outros carnívoros, sendo a ovelha, a vaca e o porco os hospedeiros intermediários mais comuns. O homem se infecta ocasionalmente por contato com o cão parasitado, assumindo também o papel de hospedeiro intermediário.

Ao lado de *Echinococcus granulosus*, três outras espécies individualizadas de *Echinococcus* são encontradas:

- *Echinococcus multilocularis*: no homem, a larva se apresenta de modo difuso, sem limites nítidos, tendo caráter infiltrante, produzindo a doença hidática alveolar
- *Echinococcus vogeli*: os cistos são múltiplos e podem estar disseminados, envolvendo grandes porções de tecido, gerando a chamada hidatidose policística
- *Echinococcus oliganthus*.

No Brasil, o agente da hidatidose cística ou unilocular é o *Echinococcus granulosus*, que, no homem, localiza-se em órgãos como o fígado e o pulmão. Quando isso não acontece, ele penetra na grande circulação e pode se instalar em qualquer outro órgão.

## ► Etiologia

### ▪ Verme adulto

Dentre as espécies do gênero *Echinococcus*, a de indiscutível interesse clínico no Brasil é o *Echinococcus granulosus*. Dessa espécie, são enumeradas algumas variantes morfológicas denominadas cepas. As mais conhecidas são as encontradas nas ovelhas, sendo sua distinção feita mediante a separação eletroforética de suas isoenzimas.

A forma adulta, sexuada, do *E. granulosus* divide-se em escólec, colo e estróbico. O escólec é globuloso e apresenta quatro ventosas. O colo é curto e estreito, sendo seguido pelo estróbico, que é composto de três a quatro proglotes – sendo uma imatura, uma a duas maduras com órgão genital e a última grávida. Esta última proglote tem útero longitudinal que pode encerrar cerca de 400 ovos no seu interior. No cão, o *E. granulosus* necessita de 4 a 10 semanas após a infecção para atingir completo desenvolvimento.

Os ovos constituem-se de um envoltório quitinoso (embrióforo) que encerra o embrião hexacanto (oncosfera). São resistentes à temperatura ambiente e, quando o ovo é digerido pelo hospedeiro intermediário, o embrióforo se rompe liberando o embrião hexacanto, o qual perfura a

mucosa intestinal e atinge a veia porta até chegar ao fígado. Normalmente, o embrião se fixa no fígado, mas pode migrar em direção ao pulmão ou ser transportado pela via circulatória para outros órgãos.

Ao se fixar, o embrião hexacanto perde os acúleos e a larva cresce lentamente. Cerca de 2 semanas após a fixação já é possível distinguir duas camadas de membranas – sendo uma interna e outra externa.

### ▪ Cisto hidático

O cisto no homem cresce em média cerca de 1 cm ao ano. O crescimento pode ser interrompido ao alcançar 5 a 10 cm, tendo contorno esférico depois de finalizado o desenvolvimento.

A hidátide desenvolvida apresenta-se como massa esférica, constituindo o cisto hidático, que é composto por membrana hidática, cápsulas prolígeras, líquido hidático e vesículas hidáticas (Figura 29.1).

► **Membrana hidática.** Composta de membrana externa, quitinosa, chamada de membrana adventícia. A membrana anista tem aspecto homogêneo, leitoso, é mais interna e tem como função ser barreira defensiva às defesas do hospedeiro. A membrana prolígera é a responsável pela proliferação do parasito, revestindo internamente todo o cisto e originando as cápsulas prolígeras.

► **Cápsulas prolígeras.** São vesículas ligadas na superfície interna da membrana germinativa. Dentro dessas cápsulas se desenvolvem os escóleces que, no seu processo evolutivo, tornam-se cistos férteis. Essas cápsulas se rompem com o tempo e formam um depósito interno denominado “areia hidática”, que pode conter até 400.000 escóleces por mL.

► **Líquido hidático.** É líquido límpido, estéril, incolor, levemente alcalino, contendo fosfatos, cloretos, glicose, ureia e outros componentes proteicos, constituindo o principal antígeno estimulador do sistema imunológico.

► **Vesículas hidáticas.** São formadas pelo envelhecimento do cisto ou problemas apresentados pelo hospedeiro, como doenças infecciosas, traumatismos, alterações químicas e outros. Essas vesículas endógenas diferem das cápsulas prolígeras por serem revestidas por cutículas e por serem férteis. As vesículas hidáticas exógenas são pouco frequentes no homem, podendo ser a causa principal da hidatidose óssea ou do peritônio.

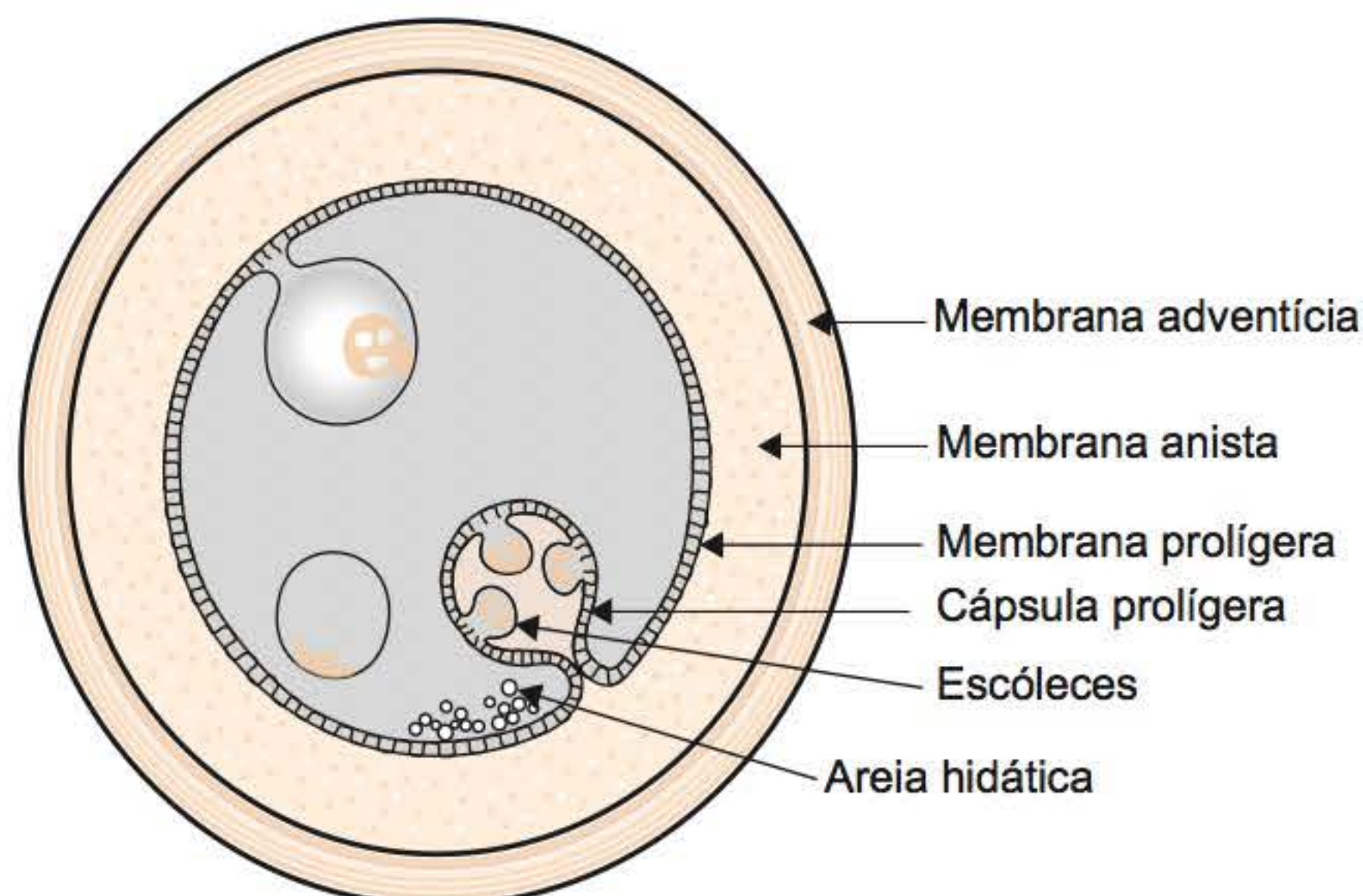


Figura 29.1 Cisto hidático.



## ► Epidemiologia

O cão, como hospedeiro definitivo do verme adulto, abriga o agente etiológico ao se alimentar com vísceras de ovelhas e bois que contêm os cistos hidáticos férteis. Os escólecex se desenvolvem no intestino delgado e o animal não apresenta sintomas ou sinais clínicos significativos.

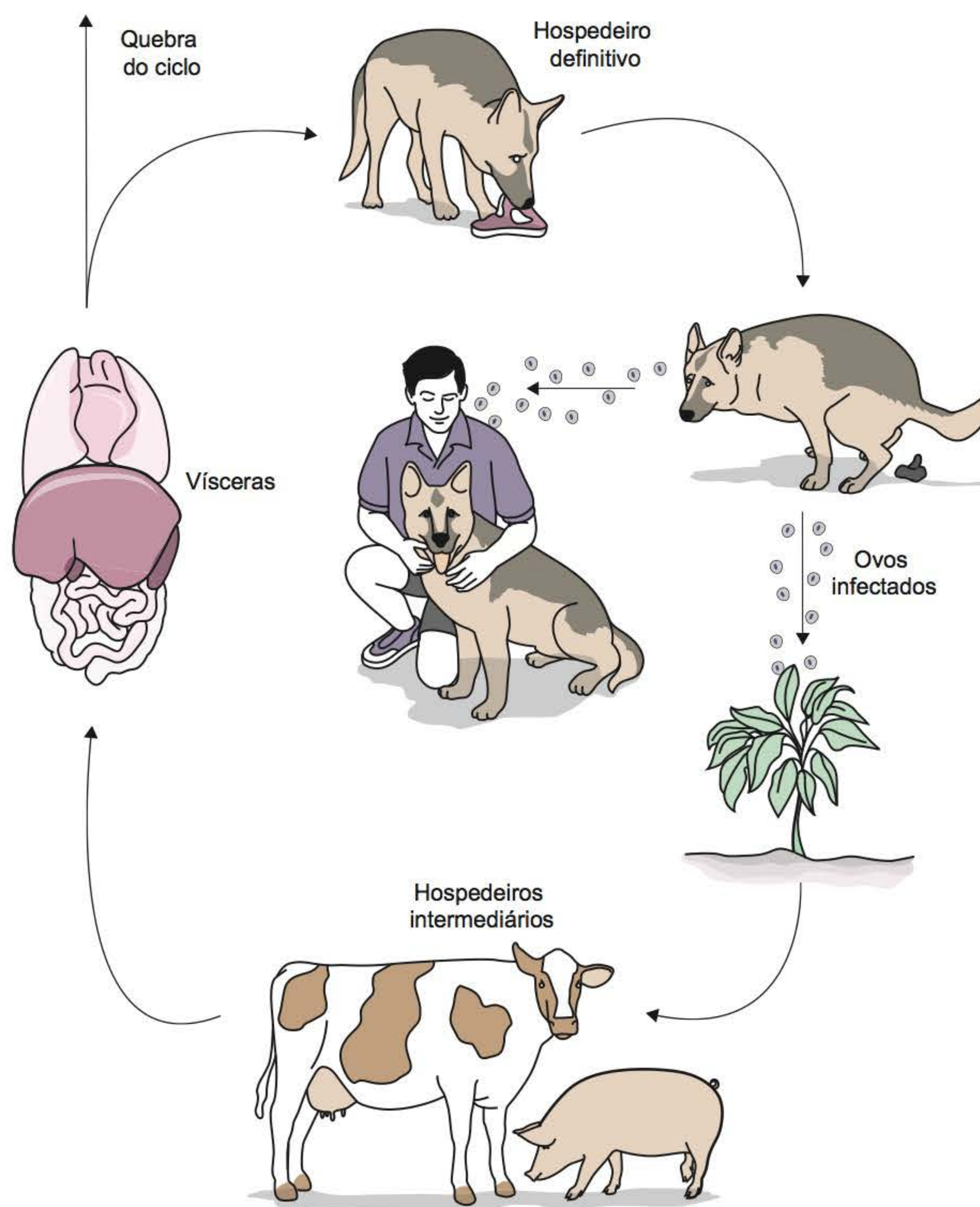
As proglotes grávidas de tênia eliminadas pelas fezes do cão espalham-se no solo, facilitando a ingestão pelo hospedeiro intermediário (ovelha, porco, boi, cabra, cavalo).

A infecção humana ocorre por contaminação direta quando os ovos da tênia se fixam ao pelo do cão nas regiões perianal e peribucal. O homem, em contato com o cão, acaba infectado. Dá-se contaminação indireta quando os ovos chegam ao aparelho digestivo pela água ou por alimentos contaminados e após disseminação, provocando a infecção (Figura 29.2).

Na análise da distribuição geográfica da hidatidose humana, encontra-se maior incidência nas regiões em que se criam ovelhas. Encontram-se cistos férteis em mais de 80% dos casos nessas áreas, proporcionando disseminação por parte dos cães que ali vivem. Ao se cotejar o índice de contaminação proporcionado pelos rebanhos bovino, caprino e suíno, vê-se que é muito menor do que aquele proporcionado pelos ovinos.

A distribuição da hidatidose ocorre em todas as latitudes, com certa predominância de regiões devido ao clima, cultura e condições socioeconômicas.

Na América do Sul, Uruguai, Argentina, Chile e Brasil apresentam a maior incidência de hidatidose, sendo que a região brasileira fronteiriça à Argentina e ao Uruguai é onde se encontra o maior número de casos da doença, com significativo índice de contaminação dos rebanhos. Hoje, este domínio já está se diluindo, visto terem sido detectados casos



**Figura 29.2** Ciclo biológico do *Echinococcus granulosus*. O hospedeiro definitivo (cão) torna-se infectado pela ingestão de vísceras de hospedeiros intermediários infectados pelo cisto hidático. Os ovos infectantes encontrados nas fezes do cão podem contaminar os hospedeiros intermediários (ovelha, porco, homem). Quando os ovos ingeridos pelo hospedeiro intermediário eclodem no estômago e liberam oncosferas, penetram no intestino, vão para a circulação e se transformam em cistos hidáticos. O crescimento do cisto causa a doença hidática no hospedeiro intermediário. O ciclo pode ser rompido se o hospedeiro definitivo não ingerir vísceras contaminadas.



de hidatidose em outras regiões do país, normalmente nas Regiões Sudeste e Norte, nas quais a criação de ovinos vem se expandindo e, conseqüentemente, destacando a existência do agente etiológico.

## ► Diagnóstico

O diagnóstico preventivo da hidatidose se fundamenta na detecção de sinais e sintomas compatíveis com a enfermidade ou ambos, em pacientes com antecedentes de residência em zonas endêmicas ou outras situações que denunciam provável infecção.

Como o quadro clínico e as imagens obtidas de várias formas se confundem com as de outras infecções similares, o diagnóstico definitivo poderá se dar mediante intervenção cirúrgica ou necropsia, pela eliminação do parasito ou partes, ou então a partir do diagnóstico laboratorial, utilizando métodos imunológicos ou de biologia molecular, valorizando-se as suas limitações.

### ▪ Avaliação clínica

O quadro clínico da hidatidose se relaciona com o estado físico do cisto e a integridade de suas membranas. Em geral, o crescimento de um ou mais cistos hialinos, com membranas intactas e líquido cristalino, pode se manifestar sob a forma de massa palpável, alterações funcionais e crescimento anormal do órgão infectado.

A evolução da hidatidose é lenta, sendo necessários muitos anos para que a sintomatologia seja evidente. Não é rara a ocorrência e a repetição de casos de hipersensibilidade tipo I devido à sensibilização do paciente, com produção de IgE e IgG4, que desencadeiam quadros alérgicos e até anafiláticos graves. Na maioria dos casos, os sinais e sintomas na hidatidose convencional dependem da localização, do volume, do tamanho e da quantidade de cistos.

Nos casos de localização pulmonar, em cerca de 20 a 30% dos pacientes infectados são frequentes as situações de dor torácica, dispnéia, hemoptise e tosse. Aproximadamente 70% dos indivíduos infectados apresentam alterações hepáticas, com quadro de dor, massa palpável, icterícia, hepatomegalia e esplenomegalia. Nas situações em que a localização dos cistos é óssea ou cerebral, podem ocorrer manifestações clínicas específicas relacionadas com o crescimento do cisto.

Por outro lado, se o paciente é portador de cisto hidático cujas membranas são alteradas por processo de calcificação, infecções microbianas paralelas ou processo de ruptura acidental, poderão ocorrer quadros obstrutivos, supurativos, dolorosos, alérgicos e outras alterações colaterais orgânicas e funcionais, bem mais intensos que aqueles observados em cistos hialinos comuns.

A hidatidose é assintomática até que o cisto tenha volume considerável ou se rompa, surgindo daí as complicações. As pequenas fissuras na hidátide provocam crises de hipersensibilidade brandas, como asma e alergias, sendo que a ruptura espontânea ou provocada pode determinar choque anafilático.

Em pessoas assintomáticas, a detecção de cistos hidáticos hialinos ou calcificados pode resultar de um diagnóstico fortuito em exame clínico de rotina, provocado por processo infeccioso concomitante, com utilização de imagens e resultados laboratoriais que detectam a incidência da infecção.

Em suma, o diagnóstico clínico da hidatidose baseia-se em probabilidades. A confirmação geralmente permanece condicionada à exploração com o uso de imagens e à complementação com métodos imunodiagnósticos.

### ▪ Avaliação por imagem

Em casos de cisto hidático, os métodos de detecção com imagens são de particular importância para estabelecer sua localização no órgão ou órgãos afetados, verificar sua morfologia, estado físico e relação com as estruturas do local onde está alojado, definindo as possíveis lesões que possa ter provocado com o seu parasitismo.

#### *Métodos radiológicos*

As imagens radiológicas variam de acordo com número, tamanho, localização e estado físico do cisto. Se o cisto é hialino e ocupa o parênquima pulmonar, a imagem vai apresentar bordas bem definidas, conteúdo homogêneo, em geral arredondado. Quando o cisto sofre alterações por ruptura ou infecções oportunistas bacterianas, perde a forma e é possível observar o nível de líquido em seu interior, com restos sedimentados.

A ruptura espontânea ou traumática do cisto pode resultar em expulsão total do líquido hidático, provocando tensionamento das membranas, o que define um sinal radiológico característico, pois apresenta estas membranas enrugadas.

As radiografias simples do tórax e abdome normalmente mostram aumento do mediastino e silhueta hepática, com visualização do cisto. Entretanto, se o crescimento deste acontece na cavidade abdominal, com evolução dentro do parênquima, os métodos radiológicos são ineficazes e não detectam o cisto.

#### *Ecografia*

A ecografia, os abscessos, os pseudocistos e os cistos, incluindo os de etiologia hidática, são observados como zonas arredondadas e irregulares, de paredes lisas e circuncrescentes. Como o conteúdo dos cistos é líquido e os sons se propagam melhor neste meio, a utilização de alta frequência, com ondas pouco penetrantes, serve para desenhar perfeitamente o seu contorno. O método é útil para o diagnóstico preventivo de outras enfermidades que geram formações vesiculares sem líquido em seu interior.

#### *Gamografia*

Trata-se de um processo de administração de componentes radioativos que se acumulam nos órgãos e cuja distribuição permite obter informações sobre sua morfologia e funcionamento. Esse método é usado para estabelecer a existência de cistos que ocupam principalmente o parênquima do fígado, baço e rins. As imagens dos cistos apresentam-se como lacunas, falta de imagens ou hiporradioativas. O processo possibilita o acerto diagnóstico em cerca de 80% dos casos de hidatidose hepática.

#### *Tomografia computadorizada*

Esta técnica registra a absorção de radiação pelos órgãos e detecta as diferenças produzidas por lesões nos tecidos afetados.

Os cistos hidáticos geralmente se revelam como imagens hipodensas, únicas ou múltiplas, de tamanho variável e com conteúdo líquido. Estas imagens, com bordas bem definidas e densas, são compatíveis com as que apresentam os abscessos e



cistos congênitos ou adquiridos, que são também impermeáveis a soluções de contraste por via endovenosa. Podem se diferenciar de outras lesões localizadas que produzem imagens comparáveis, tais como tumores primitivos benignos (heman-gioma) ou malignos (hepatomas) e as metástases neoplásicas, porque nestas penetram as soluções de contraste.

### Comentário sobre o diagnóstico por imagens

O emprego de métodos diagnósticos por imagens permite a visualização de cistos hialinos ou calcificados em pessoas assintomáticas ou afetadas por enfermidades concomitantes.

Cistos hidáticos que se desenvolvem no parênquima de órgãos como baço, fígado, rins, pâncreas e na zona retroperitoneal podem ser mostrados por ecografia ou tomografia computadorizada. Esta última é a mais indicada para a localização de cistos alojados no cérebro, ossos e na região torácica. Por outro lado, a gamografia revela com precisão os cistos intraparenquimatosos hepáticos, renais e esplênicos.

A radiografia simples permite identificar os cistos hialinos do pulmão e mediastino, assim como aqueles ligados ao diafragma, bem como a detecção de cistos calcificados em localizações distintas, apesar de apresentar dificuldades de visualização quando eles são pequenos e intraparenquimatosos.

Uma limitação de todos os métodos de detecção com imagens refere-se aos cistos pequenos, em particular os extraparenquimatosos, que não são observados por ocorrerem em plano distinto do estudado. Outra desvantagem é que os cistos abdominais rompidos, que podem provocar um quadro clínico importante com dor, icterícia ou síndrome obstrutiva de vias biliares, com frequência não produzem imagem alguma.

### ▪ Avaliação laboratorial

Pelo caráter acelular e não degradável, a capa laminar do cisto hidático não estimula o sistema imunológico do portador. Ela atua como um filtro que permite a passagem de macromoléculas, mas que impede o contato direto com as demais estruturas parasitárias, os tecidos e as células imuno-competentes do hospedeiro.

A estimulação antigênica do portador depende do extravasamento, através da capa laminar, dos antígenos do líquido hidático, os quais são produzidos na capa germinativa e se acumulam no interior do cisto. A regulação dos movimentos dos imunógenos se relaciona com a estrutura do tegumento da capa germinativa, a qual não é compatível com a passagem das macromoléculas. Por isso é necessário que ocorra alguma alteração nas condições de permeabilidade da membrana e que permita a indução de uma ação por parte dos antígenos do líquido hidático, o que vai acarretar a resposta imunológica. Desse modo, explica-se que, entre o cisto hialino não alterado, em que a liberação dos imunógenos será escassa, e o cisto hidático, que, ao se romper, expele seu conteúdo antigênico e faz com que o hospedeiro promova resposta imunológica humoral e celular intensa, haja uma ampla variedade de situações em que a quantidade de antígeno liberado alcança os mais variados níveis. Essas diferenças na estimulação são compatíveis com as grandes variações na concentração de anticorpos circulantes ou também sem estes, observada em pacientes portadores de cisto hidático demonstrado por métodos com imagens.

Devido a essa situação peculiar, semelhante ao que acontece com as manifestações clínicas, e ao próprio diagnóstico por imagens, a resposta imunológica em pessoas afetadas pelo *E. granulosus* dependerá do estado físico do cisto, da integri-

dade de suas membranas e das próprias condições da resposta dos estímulos que o paciente apresenta.

O líquido hidático contém imunógenos que estimulam o sistema imunológico do portador do cisto, razão pela qual é empregado como antígeno nas provas imunodiagnósticas. Entre as 12 diferentes populações moleculares de origem parasitária que podem ser detectadas no líquido hidático, o antígeno 5 é historicamente o mais conhecido e que alcança concentração elevada, bem como o antígeno B e as suas subunidades, que estimulam a produção de anticorpos identificados por diversas técnicas no soro de pacientes com equinococose cística.

Com os progressos alcançados no aumento da sensibilidade dos testes imunodiagnósticos, a variabilidade de antígenos comuns parasitários remete a problemas no diagnóstico específico.

A reduzida concentração de componentes parasito-específicos em preparação de antígenos de *E. granulosus* pode levar a resultados falso-negativos. Por outro lado, resultados falso-positivos estão presentes devido a reações cruzadas com outros antígenos parasitários.

Tais situações levam ao estudo, identificação, caracterização e isolamento de antígenos específicos e, neste plano, a biologia molecular, por meio da utilização de métodos de DNA recombinante, mudou o perfil da identificação dos antígenos do *E. granulosus*. Dos clones isolados, vários fragmentos do antígeno B são utilizados para a identificação específica do *E. granulosus*, como os antígenos 12 kDa e 8 kDa. Vários peptídeos sintéticos, produzidos de acordo com a sequência de aminoácidos dos clones isolados, aumentaram muito a especificidade das análises *in vitro*. Entretanto, em algumas situações, os testes, principalmente os que utilizam componentes enzimáticos, tiveram perda de sensibilidade.

### Diagnóstico imunológico

Os imunoensaios são de grande valia no diagnóstico clínico de hidatidose cística, em estudos epidemiológicos e no acompanhamento de paciente durante e após o tratamento. Esses testes, dentre os métodos não invasivos disponíveis, constituem alternativa mais específica para a detecção do *E. granulosus*. Uma variedade de técnicas está hoje disponível para a investigação, de gerações diferentes, com sensibilidades e especificidades que as diferenciam na valorização do resultado.

Atualmente, os imunoensaios empregados para o diagnóstico da hidatidose humana podem ser classificados em três categorias:

- Os que detectam o anticorpo, sem definição dos antígenos presentes no líquido hidático
- Os que detectam anticorpos antiantígeno 5 especificamente
- Os que detectam outros antígenos específicos no líquido hidático além do antígeno 5.

Obedecendo a uma sequência histórica de aplicação prática nos laboratórios clínicos, são encontradas provas disponíveis para o diagnóstico da hidatidose, as quais serão descritas a seguir.

### Intradermorreação de Casoni

Reação *in vivo* de hipersensibilidade imediata, mediada pelos anticorpos IgE e IgG4, é fácil de executar, mas de pouco valor diagnóstico, sendo pouco considerada. Consiste na injeção de 0,1 a 0,2 ml de antígeno – líquido hidático fértil por via intradérmica. A reação de hipersensibilidade imediata



detectando anticorpo específico acontece após 10 a 30 min da aplicação, surgindo uma pápula de mais de 2 cm de diâmetro, contida por zona periférica avermelhada.

Pode acontecer reação tardia, verificada 24 h após a aplicação do antígeno, ocorrendo na falta de reação imediata e apresentando uma zona inflamatória endurecida, arredondada, acompanhada de febre, o que caracteriza a ação de macrófagos e linfócitos, que liberam citocinas, induzidos por um estímulo imunológico celular.

A reação é pouco específica, podendo apresentar cerca de 30% de reações falso-positivas, tendo também pouca sensibilidade, visto que em torno de 42% de casos apresentam reações falso-negativas.

Hoje, a reação intradérmica de Casoni está sendo reavaliada na sua condição diagnóstica devido à possibilidade de identificação da IgE específica antilíquido hidático total observada por outras técnicas imunológicas.

### Aglutinação passiva

Reação normalmente utilizada para levantamentos epidemiológicos, servindo como reação de triagem. A reação utilizando partículas de látex com antígeno hidático é executada de modo qualitativo, observando-se uma diluição do material biológico de 1:5. A sensibilidade é de cerca de 90%, tendo baixa especificidade, alcançando um índice de falso-positivos de aproximadamente 25% dos casos, havendo um cruzamento com anticorpos contra outros antígenos parasitários.

### Floculação da bentonita

É uma prova tão sensível quanto a aglutinação passiva utilizando partículas de látex, porém é mais específica. Também é um teste qualitativo em que se consideram os títulos iguais a 1:5 como positivos, podendo ser realizado também como teste de triagem. É uma reação pouco utilizada em laboratório clínico devido ao baixo potencial diagnóstico que apresenta quando comparada a outras reações imunológicas.

### Hemaglutinação passiva

O suporte inerte utilizado para a reação são hemácias de carneiros taninizadas, às quais o antígeno hidático total está associado. É o método semiquantitativo mais utilizado devido à possibilidade de padronização, facilidade de execução e resultados altamente reprodutíveis. Os testes são considerados positivos quando alcançam títulos iguais ou superiores a 1:32. Valores inferiores, no entanto, não descartam a possibilidade da doença hidatidose. As limitações de resultados acontecem principalmente quando o cisto é pulmonar ou vertebral, sendo a reação positiva, nestes casos, em apenas 50%. Quando o cisto é hepático, a taxa de anticorpos específicos tem aumento significativo, tornando a reação com alta incidência de positividade, atingindo 95% dos casos. A reação de hemaglutinação apresenta boa especificidade; no entanto, pacientes infectados por equinococose multilocular e fasciola hepática podem apresentar anticorpos que reagem cruzadamente, proporcionando resultados falso-positivos.

### Fixação do complemento

A reação de reprodutibilidade relativa é hoje desconsiderada no diagnóstico preferencial da hidatidose. A baixa sensibilidade do teste, aliada à dificuldade de padronização dos reativos e reagentes utilizados, tornam a técnica excluída do rol daquelas utilizadas em rotina laboratorial para o diagnóstico de doença hidática.

### Imunofluorescência indireta

Com a utilização do líquido hidático como antígeno fixado à lâmina, a especificidade da reação chega a 80%. A reação é semiquantitativa, sendo considerados os títulos iguais ou superiores a 1:80 como positivos, isto devido à sensibilidade do teste, que chegou a 95%. O problema maior relativo aos resultados é que os pacientes portadores de complicações hepáticas podem produzir falsos resultados positivos, independentemente do cisto no órgão. Quando ocorre infecção hidática no pulmão, a taxa de anticorpos é menor, apresentando um índice de positividade que atinge 55%. É considerado teste complementar de triagem, não devendo ser utilizado de maneira isolada para o diagnóstico.

O uso de antígenos purificados, principalmente o antígeno 5, proporciona o desenvolvimento de metodologias que ainda são utilizadas como referência para o diagnóstico definitivo da hidatidose, embora hoje se saiba que esta informação, passada para a cultura médica como definitiva, encontra novas situações laboratoriais que a contradizem.

As reações de precipitação, que se confundem com a história da imunologia, são as técnicas referenciais para a determinação do arco 5 por meio de seus anticorpos correspondentes, sendo a imunoeletroforese a mais citada e conhecida. Embora seja tão cultuada no diagnóstico da hidatidose, encontra em outra reação de precipitação um concorrente à altura como prova diagnóstica, ou seja, a imunodifusão radial dupla.

### Imunodifusão radial dupla (dupla difusão em gel)

Utilizando a propriedade da difusão radial das proteínas em meio semissólido, foi desenvolvido o teste de imunodifusão radial dupla para a pesquisa de anticorpos contra o antígeno 5, o qual representa alta especificidade, mas sensibilidade menor do que a outros testes disponíveis.

A especificidade do teste chega a 93%, mas é importante assinalar que têm sido detectados anticorpos anti antígeno 5 em soro de pacientes portadores de *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* e *Cysticercus celluloaseae*, o que não nos permite afirmar com segurança que em testes de dupla difusão em gel, com a detecção do arco 5, há infecção pelo *Echinococcus granulosus*.

O método é de grande simplicidade, tendo como problema maior o tempo de duração da reação, cujo resultado só será conhecido com segurança após um período que varia de 24 a 72 h, o que não permite diagnóstico rápido. Por isso utiliza-se para detecção do antígeno 5 o teste da dupla difusão em gel, como prova confirmatória.

### Imunoeletroforese

É o processo laboratorial que reúne a eletroforese convencional e a imunodifusão radial dupla. Trata-se de prova artesanal que exige equipamento eletroforético e permite a identificação de anticorpos específicos para o antígeno 5. A reação apresenta sensibilidade de 75 a 85% e uma expressão maior de resultados reagentes quando os cistos se rompem e liberam quantidade de antígeno. Esse aumento permite maior precisão na verificação do arco de precipitação, proporcionando um resultado mais seguro. É um método que apresenta a mesma especificidade da imunodifusão radial dupla, sendo reação confirmatória, e não diagnóstica definitiva. Devido às várias etapas exigidas na realização do teste, aliadas à necessidade de equipamento eletroforético, o método tem sido pouco utilizado como rotina nos laboratórios clínicos.



### Contraímunoeletroforese

Obedece ao princípio da eletrossinérrese, em que os anticorpos em meio semissólido, com a passagem de corrente elétrica constante, são arrastados em direção ao cátodo (polo negativo). Como os antígenos são carregados eletronegativamente, dirigem-se ao polo positivo; no momento em que os anticorpos encontram a substância que os estimula, ocorre a precipitação do complexo. É uma prova de imunoprecipitação utilizada em conjunto com a imunodifusão radial dupla, servindo como triagem desta, visto que oferece resultados mais rápidos em menos tempo (2 a 4 h). É a reação menos sensível e específica que a dupla difusão, sendo também necessário um bom equipamento eletroforético para a execução do método.

Os resultados obtidos com as reações descritas suscitam dúvidas quanto à existência do agente etiológico da hidatidose. Apesar de serem obtidos resultados razoáveis com antígenos não purificados ou semipurificados do líquido hidático, são necessárias técnicas mais específicas para uma definição da infecção, doença ou sanidade do indivíduo. Peptídios obtidos por técnicas de recombinação, como antígeno B da hidatidose, aumentam a especificidade. A determinação de anticorpos referentes às subunidades peptídicas de 8 a 12 kDa, de 16 a 20 kDa ou 32 kDa, aliada à técnica de geração mais evoluída, permite investigações diagnósticas mais precisas, com menor risco de reações cruzadas. Com o avanço tecnológico, as classes de anticorpos são identificadas com maior precisão, permitindo a análise da fase da doença, seu monitoramento e prognóstico da evolução do quadro clínico.

### Radioimunoensaio

Hoje, é utilizado para captura do anticorpo IgE específico contra o antígeno hidático. É um teste limitado a alguns laboratórios, haja vista os óbices legais que envolvem a metodologia para radioisótopos. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, a qual detecta uma classe específica de imunoglobulina (IgE), que indica quadros de hipersensibilidade tipo I, surgida de sensibilização de paciente com pequenas concentrações de antígeno hidático extravasadas dos cistos. O teste, pela sua alta sensibilidade, pode capturar anticorpos específicos contra os antígenos hidáticos, principalmente naqueles casos em que as outras imunoglobulinas não são detectadas pelos métodos convencionais. A especificidade do teste atinge em torno de 94%, com sensibilidade de 96%, sendo valorizado nos casos em que os cistos hialinos ou calcificados liberam baixas concentrações de antígeno.

### Testes imunoenzimáticos

Utilizando o antígeno total, sem purificação, pode-se desenvolver uma metodologia de alta sensibilidade, a técnica heterogênea denominada ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), comparada à imunofluorescência indireta e que apresenta os mesmos problemas relativos à especificidade. Esse método alia a simplicidade de execução ao uso de equipamentos convencionais de laboratório, bem como permite a quantificação dos anticorpos, possibilitando resultados reprodutivos, controle de qualidade da reação e monitoramento do paciente frente à infecção com melhor critério.

Em contrapartida à sua alta sensibilidade (em torno de 98%), a especificidade deixa a desejar, ocorrendo reações cruzadas com anticorpos antitoxoplasma, anticisticerco, antitripanossoma, o que exige testes complementares para a confirmação do diagnóstico da hidatidose. Apesar dessas dificuldades, o teste pode ser padronizado no laboratório e apre-

sentar resultados mais reprodutivos e fáceis que a aglutinação indireta, tanto com partículas de látex quanto com partículas de bentonita, sendo utilizado como um teste de triagem mais bem elaborado.

► **Teste imunoenzimático fluorimétrico específico.** Metodologia que emprega o antígeno hidático purificado, no qual são pesquisados anticorpos específicos (IgG1, IgG4 e IgE) contra antígenos particulares da hidatidose. O uso do antígeno purificado permite uma reação sensível, atingindo cerca de 90% dos casos, com uma especificidade próxima de 93%. Os antígenos purificados indicam as proteínas B e 5, sendo utilizado o método ELISA com variante imunoenzimática mais adequada, o que permite a observação de resultados qualitativos e quantitativos reprodutíveis.

O teste imunoenzimático fluorimétrico específico é importante também para diferenciar a hidatidose produzida pela infecção pelo *E. granulosus* da doença hidática alveolar produzida pelo *E. multilocularis*. O antígeno Em2 purificado do *E. multilocularis* apresenta reações sorológicas positivas em 95% dos casos de doença hidática alveolar, o que não ocorre na hidatidose produzida pelo *E. granulosus*, que apresenta reações para outros antígenos específicos.

Antígenos circulantes têm sido detectados no soro de pacientes com equinococose cística, acontecendo também em pacientes com reações negativas para anticorpos antiequinococos. O uso de anticorpos monoclonais oriundos de antígenos purificados, gerados pela clonagem com DNA recombinante, possibilita o desenvolvimento de metodologias mais específicas, com a captura dos antígenos circulantes. A variante de técnica mais utilizada hoje com esse propósito é a do ensaio imunoenzimático heterogêneo (ELISA), aplicada em pesquisa e avaliação laboratorial confirmatória.

► **Imunoeletrotransferência.** Procedimento laboratorial *in vitro* em que se separa a amostra de antígeno hidático em um gel analítico de focalização isoeletrica. As moléculas separadas são transferidas para membranas de nitrocelulose por reações eletroforéticas. Essa membrana marcada (*blot*) que apresenta os vários antígenos separados (8, 16, 21 e 38 kDa e outros) serve como base para uma reação de descrição dos peptídios individualmente, sendo obtida uma especificidade de 99%, enquanto a sensibilidade varia entre 70 e 75%. Isso permite a confirmação dos resultados de triagem que utilizam metodologias menos específicas.

Analisando antígenos isoladamente, verifica-se uma frequência das bandas de 8 kDa em pacientes portadores de cistos pulmonares. Entretanto, esse antígeno não é específico, podendo ocorrer reações cruzadas com cisticercose. Os antígenos de 16 e 21 kDa são mais específicos e eficientes para determinar anticorpos em indivíduos com cistos hepáticos, não havendo praticamente reação cruzada com outros organismos parasitários; observa-se também que a banda de 38 kDa apresenta sensibilidade tanto para hidatidose pulmonar quanto hepática, porém pode apresentar reação cruzada com cisticercose. Os métodos de imunoeletrotransferência utilizados para o diagnóstico da hidatidose – *immunoblots* e *immunodots* – são mais eficientes e precisos na determinação de anticorpos contra cistos hepáticos, tendo menor sensibilidade para casos de hidatidose pulmonar. São testes confirmatórios importantes para avaliações epidemiológicas ou individuais.

### Diagnóstico molecular

Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular têm provado serem ferramentas importantes para a descrição dos antígenos de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, proporcionando



a identificação de sequência de aminoácidos e a evidência de epitopos específicos. Há, nos dias de hoje, clara evidência da diversidade genética apresentada pelas espécies de interesse clínico do gênero *Echinococcus*, o que condiciona importantes implicações no desenvolvimento de novas vacinas e medicamentos aplicados ao tratamento e prevenção da hidatidose. A significância epidemiológica da variação genética do *E. granulosus* tem sido discutida mais intensamente nos últimos anos, principalmente após a implementação de técnicas moleculares de biotipagem ou *fingerprint*, que permitem a distinção das linhagens com alta acurácia, de acordo com as regiões geográficas de isolamento do parasito. *E. granulosus* representa maior variação intraespecífica quando comparado às demais espécies do gênero, o que esclarece o motivo da diferenciada virulência intraespecífica, bem como sua variabilidade na suscetibilidade aos tratamentos convencionais.

A variação genética pode ser investigada em ambos os genomas, nuclear e mitocondrial. As unidades repetidas do DNA ribossômico têm sido extensivamente testadas para estudos de filogenia e tipagem, demonstrando ser uma região de escolha para essas aplicações. Entretanto, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem se mostrado mais vantajoso para a discriminação de organismos estreitamente relacionados, devido a sua taxa de evolução relativamente rápida quando comparado com rDNA, ser haploide e não recombinar, fornecendo maior sensibilidade para a aplicação na biotipagem.

Análise do genoma de *Echinococcus* obtido por meio do tratamento do DNA com enzimas de restrição, denominado RFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) é uma das ferramentas mais utilizadas como método de identificação e diferenciação de isolados microbianos. Os primeiros estudos envolvendo a variação genotípica nos isolados de *Echinococcus* envolvem o RFLP associado a uma técnica convencional de hibridização – *southern blotting*. No entanto, embora esse método apresente ótima sensibilidade e especificidade, tem alto custo para implementação, bem como requer um tempo de análise maior, dificultando a sistematização na rotina laboratorial. Consequentemente, a técnica foi simplificada, sem perda de resolução ou precisão, vinculando RFLP com a amplificação por PCR de sequências do DNA ribossômico. O rDNA tem regiões transcritas altamente conservadas e é subdividido por espaçadores internos e externos (ITS e ETS), que, por sua vez, são relativamente mal conservados e removidos posteriormente para formar os ribossomos. A sequência ITS é a região escolhida para o desenho dos iniciadores, tendo como produto da PCR um amplificado que se estende desde a região ITS até a unidade de repetição de rDNA, e inclui a maioria dos genes da subunidade 5.8S. Esse produto é digerido com uma série de quatro enzimas de restrição, produzindo padrões característicos de RFLP, possíveis de identificar e diferenciar as espécies patogênicas do gênero *Echinococcus*.

Análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD-PCR), também conhecida como PCR com *primer* arbitrário (AP-PCR), utiliza iniciadores ou *primers* de 10 pb escolhidos ao acaso, sem o conhecimento do genoma. A identificação e diferenciação de isolados de *Echinococcus* por meio de RAPD é mais simples, rápida e altamente eficaz na investigação epidemiológica, além disso, a técnica consome um tempo menor do que a análise por RFLP. Usando condições cuidadosamente controladas na rotina do diagnóstico da hidatidose, RAPD-PCR mostrou-se útil para distinguir as quatro espécies reconhecidas *Echinococcus*, bem como as geneticamente distintas formas de *E. granulosus*.

A informação de sequências de genes taxonômicos em bases de dados públicas de livre acesso (*Genbank database*) tem permitido o sequenciamento comparativo de genes homólogos entre linhagens microbianas, e é hoje considerado o método padrão-ouro em identificação microbiana. O sequenciamento de regiões do DNA mitocondrial (mtDNA), particularmente porções dos genes codificadores de proteínas mitocondriais, subunidade 1 do citocromo oxidase (COX1-391 pb) e o gene NADH desidrogenase 1 (ND1-470 pb), provaram alta especificidade na identificação de isolados de *E. granulosus*. Além da identificação precisa, é possível com essas regiões diferenciar os 10 haplótipos de maior interesse, tanto para a clínica médica quanto para as análises veterinárias. Em estudos com diversos isolados de *Echinococcus*, utilizando essas sequências taxonômicas, as quatro espécies reconhecidamente patogênicas (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli*) oriundas de diferentes mamíferos e regiões geográficas eram claramente identificadas e distinguidas, demonstrando a eficácia e precisão do método. Haplótipos mitocondriais de interesse na clínica médica, como G1, G2, G5, G6 e G7, que têm o homem como hospedeiro intermediário e são encontradas prevalentemente na América do Sul, são facilmente identificados, permitindo melhor entendimento da epidemiologia da hidatidose.

A análise da variabilidade de microssatélites é a técnica de escolha em estudos forenses para a identificação e diferenciação de indivíduos, bem como de estudos evolutivos entre espécies e populações. Um microssatélite *multilocus* foi identificado em *Echinococcus* com repetições de CA e GA, sendo denominado EmsB. O polimorfismo do tamanho desses microssatélites amplificados se mostrou eficiente para diferenciar isolados do emergente *E. multilocularis* de mesmas localidades, demonstrando ser uma promissora ferramenta na tipagem de isolados da baixa prevalência na população.

### Comentário sobre o diagnóstico laboratorial

Na hidatidose, os sinais e sintomas clínicos e a resposta imunológica se relacionam com o estado do cisto e suas membranas. Em muitos casos, a existência do cisto hidático não é observada em métodos por imagem, mas as alterações em suas membranas, que permitem a saída dos antígenos do líquido hidático em quantidades razoáveis, leva à indução de anticorpos detectáveis por métodos laboratoriais *in vitro*. À medida que o cisto aumenta de tamanho, podem-se observar, por meio da detecção por imagens, como a ecografia e a tomografia, a evolução do cisto e suas características, que promovem o diagnóstico efetivo da hidatidose. Por outro lado, a semelhança das imagens dos cistos da hidatidose com outras enfermidades não permite a confirmação diagnóstica pré-cirúrgica; normalmente, os cistos pequenos, mesmo por testes de ressonância magnética, não são detectados.

Nestes casos, os métodos diagnósticos imunológicos têm grande valor. Entre as técnicas conhecidas, parâmetros são difundidos para diagnóstico preciso e confirmação de infecção pelo *E. granulosus*.

Analisando todas as técnicas disponíveis e citadas para o diagnóstico da hidatidose, sugere-se o seguinte esquema para que se obtenha um resultado sensível, específico e reprodutível:

- Submeter o material biológico inicialmente a triagem, utilizando como técnica preferencial a reação imunoenzimática heterogênea (ELISA) desenvolvida com antígeno total. Poderão ser pesquisados os anticorpos totais ou diferenciados, como IgG1, IgG4 ou IgE, caracterizando a infecção e até o seu estágio. É importante salientar a possibilidade de dosagem específica da IgE, que aparece em situações de pequena sensibilidade do paciente com o antígeno hidático, nos casos de reações sorológicas negativas para a detecção dos outros anticorpos convencionais (IgG, IgA



**Comentário sobre o diagnóstico laboratorial (continuação)**

ou IgM). Como alternativa para a reação imunoenzimática, a reação de hemaglutinação indireta, semiquantitativa, é a opção menos sofisticada e de menor sensibilidade, porém indicada como teste de triagem para o diagnóstico da hidatidose

- Desenvolver provas secundárias no soro pré-testado para a confirmação dos resultados. O método principal é o de imunoeletrotransferência para a identificação dos antígenos 8, 16, 21 e 38 kDa, que apresenta alta especificidade e boa sensibilidade, servindo como elemento indicativo da doença provocada pelo cisto hidático.

A reação de imunodifusão radial dupla para a pesquisa do arco 5 (DD5) é técnica que deverá ser desenvolvida concomitantemente à imunoeletrotransferência, servindo também como alternativa de método confirmatório, apesar de ser menos específica e poder apresentar reações cruzadas.

Resultados negativos para a pesquisa de anticorpos IgG, IgA e IgM pelos métodos citados deverão ser confrontados com os resultados de pesquisa de antígenos específicos para o *E. granulosus*.

Esgotadas as alternativas de pesquisa de anticorpos específicos, podemos, por meio de métodos de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolver outras opções diagnósticas, hoje já plenamente validadas e apresentando resultados de alta confiabilidade, utilizadas na rotina de laboratórios especializados.

Portanto, na análise da hidatidose, é importante avaliar o estado clínico do indivíduo, que estará intimamente relacionado com a condição do cisto, a avaliação por intermédio de métodos por imagem, o que deverá ser acompanhado pelo suporte imunológico e molecular, definindo as várias instâncias diagnósticas em casos de suspeita da doença.

## ► Bibliografia

- Ahmadi NA, Hamidi M. A retrospective analysis of human cystic echinococcosis in Hamedan province, an endemic region of Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102: 603-609.
- Al-Yaman FMK, Nobloch J. Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37: 101-108.
- Al-Yaman FM, Knobloch J. Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37: 101-108.
- Allan JC, Craig PS, Garcia Noval J *et al.* Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and teniasis in dogs and humans. *Parasitology* 1992; 104: 347-355.
- Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 21-24.
- Bart JM, Knapp J, Gottstein B *et al.* EmsB, a tandem repeated multiloci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect Genet Evol* 2006; 6: 390-400.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 1995; 110: 317-328.
- Chamekh M, Grass-Masse H, Bossus M *et al.* Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. *J Clin Invest* 1992; 89: 458-464.
- Coltorti EA, Varela Díaz VM. Inmunología e inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. *Med Argent* 1980; (1: serie) 6: 135-147.
- Coltorti EA. Inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. Detección de anticorpos anti antígeno 5 mediante la prueba de electrosinéresis em acetato de celulosa. *Medicina (Buenos Aires)*, 1983 43: 625-628.
- Craig PS. Detection of specific circulating antigen, immune complex and antibodies in human hydatidosis from Trukana (Kenya) and Great Britain by enzyme immunoassay. *Parasite Immunol* 1986; 8: 171-188.
- Criscione CD, Poulin R, Blouin MS. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 2005; 14: 2247-57.
- D'Amelio R, Pontesilli O, Dayal R *et al.* Characterization of parasites antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF. *Med Microbiol Immunol* 1985; 174: 43-50.
- Eckert J, Pawlowski Z, Dar FK *et al.* Medical aspects of echinococcosis. *Parasitol. Today* 1995; 8: 273-276.
- Edelweiss EL. Hidatidose. In: Veronese R. (ed.) *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. ed. 1976; p. 858-868.
- Felleisen R, Gottstein B. Comparative analysis of full-length antigen II/3 from *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. *Parasitology* 1994; 109: 223-232.
- Gottstein B, Eckert J, Michael SA, Thompson RG. *Echinococcus granulosus* antigen: immunoelectrophoretic and western blot analysis of hydatid cyst fluids. *Parasitol Res* 1987; 73: 186-189.
- Gottstein B, Jacquier P, Bresson-Hadni S *et al.* Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis* infection of humans) by Em2plus-ELISA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 373-376.
- Gottstein B, Schantz DM, Todorov T *et al.* An international study on the serological differential diagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Bull WHO*, 1986; 64: 101-105.
- Gottstein B, Tschudi K, Eckert J. Em2 ELISA for the follow up of alveolar echinococcosis after complete surgical resection of liver lesion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 383: 389-393.
- Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 248-261.
- Grabbe E, Kern P, Heller M. Human echinococcosis diagnostic value of computed tomography. *Trop Med Parasitol*, 1981; 32: 35-38.
- Guarnera EA, Varela Díaz VM. Immunodiagnosis of abdominal hydatid disease: difficulties in the radiologic and scintillographic localization of cysts. *Med J Austral* 1984; 140: 493-495.
- Guarnera EA, Varela Díaz VM. Immunodiagnosis of pulmonary hydatid disease in a patient with negative radiologic and scintillographic findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 149-150.
- Guisantes JA, Rubio MF, Diaz R. Aplicación de um método imunoenzimático (ELISA) al diagnóstico de la hidatidosis humana. *Bull of Sanit Daman* 1981; 90: 160-167.
- Helbig M, Frosch PM, Kern P *et al.* Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigen. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3211-3215.
- Iacona A, Pini C, Vicari G. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 95-102.
- Kagan IG, Maddison SE. Serodiagnosis of parasitic diseases. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JC, Penn GM (eds.). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 4.ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1992; 529-543.
- Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IMS *et al.* Specific antibodies in semen of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J Med Microbiol* 1992; 36: 46-51.
- King CH. Cestodes (Tapeworms). In: Mandell GL, Benett LE, Dolin R (eds.). *Principles and Practice of Infection Diseases*. 4. ed. New York: Churchill Livingstone Inc., 1995; p. 2544-2553.
- King CH. Cestodes (tapeworms). In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R. (eds.). *Principles and Practice of Infections Diseases*, 4. ed., Churchill Livingstone Inc., 1995; p. 2544-2553.
- Leggatt GR, Yang W, MacManus DP. Serological evaluation of the 12 kD subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 189-192.
- Lightowers MW, Gottstein B. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Limbery AJ (eds.). *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International, Oxon, 1995; p. 355-410.
- Lightowers MW, Liu D, Haralambous A *et al.* Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37: 171-182.
- Lightowers MW. Immunology and molecular biology of *Echinococcus* infections. *Int J Parasitol* 1990; 20: 471-478.
- Liu D, Lightowers MW, Rickard MD. Evaluation of a monoclonal antibody-based competition ELISA for the diagnosis of human hydatidosis. *Parasitology* 1992; 104: 357-361.
- Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM *et al.* A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8kDa. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 377-383.
- Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM *et al.* A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 377-383.
- Mahmoud AAF. (ed.) *Tropical and Geographical Medicine*. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1990; p. 505-528.
- McManus DP, Smyth JD. Hydatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitol Today* 1982; 2: 163-167.
- McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 2003; 127: 37-51.
- McManus DP. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 151-157.



- Moro PL, Gilman RH, Wilson M *et al.* Immunoblot (Western Blot) and double diffusion (DDS) tests for hydatid disease cross react with sera from patients with cysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 86: 422-423.
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 2007; 134: 713-722.
- Persat F, Vincent C, Mojon M, Petavy AF. Detection of antibodies against glycolipids of *Echinococcus multilocularis* metacestodes in sera of patients with alveolar hydatid disease. *Parasitol Immunol* 1991; 13: 379-389.
- Rickard MD, Honey RD, Brumley JL *et al.* Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. II. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens. *Pathology* 1984; 16: 211-215.
- Rickard MD, Lightowlers MW. Immunodiagnosis of hydatid disease. In: Thompson RC. (ed.) *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. London: George Allen and Unwin, 1986; p. 217-249.
- Rickard MD, Lightowlers MW. Immunodiagnosis of hydatid disease. In: Thompson RCA (ed.). *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. George Allen & Unwin, London, 1986; p. 217-249.
- Rickard MD. Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. I. Latex agglutination and immunoelectrophoresis using crude cyst fluid antigen. *Pathology* 1984; 16: 207-210.
- Schantz PM, Gottstein B. Echinococcosis (Hydatidosis). In: Walls KW, Schantz PM (eds.). *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases*, vol. 1. Helminthic Diseases. New York: Academic Press, Inc., 1986; p. 69-107.
- Schantz PM, Kagan LG. Echinococcosis (hidatidosis). In: Houba V (ed.). *Immunological Investigation of Tropical Parasitic Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1980; p. 104-129.
- Schantz PM, Shanks D, Wilson M. Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 609-612.
- Schwabe CW. Current status of hydatid disease: a zoonosis of increasing importance. In: Thompson RCA (ed.). *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. George Allen and Unwin, London, 1986, p. 81-113.
- Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 25: 143-154.
- Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 25: 143-154.
- Siracusano A, Ioppolo S, Notargiacomo S *et al.* Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by immunoblotting. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 239-243.
- Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 474-368.
- Sjolander A, Guisantes JA, Torres-Rodriguez JM, Schroder H. The diagnosis of human hidatidosis by measurement of specific IgE antibodies by enzyme immunoassay. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 213-218.
- Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 2002; 18: 452-457.
- Thompson RCA. Biology and systematic of *Echinococcus*. In: Thompson RCA (ed.). *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. London: George Allen and Unwin, 1986; p. 5-43.
- Torgerson PR, Deplazes P. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends Parasitol* 2009; 25: 164-170.
- Varela Díaz VM, Coltorti EA, Prezioso V *et al.* Evaluation of three immunodiagnostic tests for human hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 312-319.
- Varela Díaz VM, Coltorti EA. Immunodiagnostic confirmation of hydatid disease in patients with a presumptive diagnosis of infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26: 87-96.
- Varela Díaz VM, Coltorti EA. Limitaciones de la intradermoreacción de Casóni en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. *Bol of Sanit Panam* 1974; 76 (5): 400-405.
- Varela Díaz VM, Guarnera EA, Coltorti EA. Ventajas y limitaciones de los métodos inmunológicos y de detección por imágenes para el diagnóstico de la hidatidosis. *Bol of Sanit Panam* 1986; 100(4): 369-383.
- Verastegui M, Moro P, Guevara A *et al.* Enzyme-Linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (6): 1557-1561.
- Wen H, Craig PS, Ito A. *et al.* Immunoblot evaluation of IgG and IgG-subclass antibody responses for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89: 485-495.
- Wen H, Craig PS. Immunoglobulin subclass response in human cystic and alveolar echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 51: 741-748.
- Wilson M, Schantz PM, Pieniazek N. Diagnosis of parasitic infections: immunologic and molecular methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA *et al.* (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1995, p. 1159-1170.
- Xue HC, Qiu LS, Zhang YH *et al.* Preliminary report on antibody detection in hydatid disease using the enzyme-linked immunotransfer blot technique (western blot). *Endemic Dis Bull* 1987; 2: 62-65.



## Capítulo 30

---

# Neurocisticercose

*Adelaide José Vaz e  
José Antônio Livramento*

- Introdução, 348
- Imunobiologia da neurocisticercose humana, 348
- Aspectos clínico-epidemiológicos, 348
- Diagnóstico da neurocisticercose, 349
- Considerações finais, 350
- Bibliografia, 350



## ► Introdução

A cisticercose humana representa relevante problema de saúde pública em áreas carentes de condições sanitárias, bem como de políticas de saúde para controle da teníase humana, preocupando também autoridades sanitárias de países que recebem imigrantes de regiões endêmicas.

O ser humano, hospedeiro definitivo, alberga no intestino delgado o verme adulto, *Taenia solium*. Os ovos eliminados nas fezes contaminam o ambiente, e, conseqüentemente, a água e os alimentos. Após a ingestão de ovos viáveis pelo hospedeiro intermediário – o suíno –, o embrião hexacanto é liberado no intestino delgado depois da ruptura da casca quitinosa calcária do ovo. O embrião atravessa a mucosa intestinal por meio de seus acúleos e chega aos tecidos e aos órgãos, desenvolvendo-se até a forma larvária, cisticerco. O suíno é o hospedeiro intermediário natural, com grande suscetibilidade para a infecção. Completando o ciclo, o ser humano, ao ingerir carne suína com cisticercos viáveis, permitirá o desenvolvimento do verme adulto a partir da fixação das ventosas e acúleos do parasito na mucosa intestinal humana. Acidentalmente, o indivíduo pode infectar-se também com a forma embrionária quando ingere água e alimentos contaminados com ovos viáveis. Nesse caso, ocorre a cisticercose humana. Maus hábitos de higiene, presença de portadores de teníase, água e alimentos contaminados, condições sanitárias deficientes e educação sanitária ausente ou insuficiente estão associados a ambas as infecções – teníase e cisticercose.

A localização do cisticerco depende da migração das oncosferas, que ocorre de maneira ativa. Entretanto, permanece discutível se essas oncosferas depositam-se em tecidos específicos ou se acabam se alojando passivamente em tecidos com grande fluxo sanguíneo, como cérebro e músculos. Nos suínos, a cisticercose se apresenta mais frequentemente sob a forma disseminada; em humanos, a *neurocisticercose* (NC), forma neurológica, é a mais estudada, possivelmente por ser a apresentação clínica mais grave.

Na dinâmica da manutenção dos complexos teníase humana e cisticercose humana e animal, alguns fatores estão envolvidos: *extrínsecos*, como temperatura ambiente, umidade e agentes dispersores de ovos do parasito; *socioeconômicos*, como manejo na criação de suínos, comportamento alimentar dos hospedeiros, legislação, fiscalização e educação sanitária da população; e *intrínsecos*, como potencial biótico do parasito e imunidade natural e adquirida dos hospedeiros.

## ► Immunobiologia da neurocisticercose humana

No sistema nervoso central (SNC), as infecções podem ser acompanhadas de modificações nos compartimentos intra e extracelulares, sendo as primeiras de difícil investigação. As alterações extracelulares podem ser investigadas de modo indireto pelo estudo do líquido cefalorraquidiano (LCR).

Em condições imunológicas satisfatórias, a presença de cisticercos no SNC estimula o sistema de defesa local, que apresenta aspectos de progressão lenta e crônica, com surtos sucessivos de agudização sem periodicidade caracterizada. As fases mais intensas ocorrem quando da morte e degeneração do parasito, com liberação maciça de antígenos e quadro clínico aparente. No laboratório, observa-se a exacerbação da

resposta imune detectada no LCR, ou seja, a presença de células inflamatórias e anticorpos.

O cisticerco, após seu desenvolvimento pleno, mantém mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro. Contudo, em um período estimado de meses a mais de 10 anos, a larva frequentemente entra em degeneração, com conseqüente fibrose e calcificação.

A resposta imune celular do hospedeiro na cisticercose tem papel ainda pouco compreendido. O processo degenerativo do parasito é correlacionado com a resposta imune-inflamatória do hospedeiro, infiltrado de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e macrófagos; em seguida, forma-se o granuloma circundando o parasito; fibroblastos e colágeno se depositam sobre o granuloma; e, ao final, restam corpúsculos calcários e fibrose. A calcificação final permanece como sequela e pode determinar sintomas, como na forma convulsiva.

## ► Aspectos clínico-epidemiológicos

Durante a fase de invasão e instalação das oncosferas, a sintomatologia apresenta-se de modo brando ou, mais frequentemente, está ausente. Os sintomas e eventuais sequelas surgem, na maioria das vezes, meses ou até anos após o início da infecção, em função dos fenômenos imunobiológicos característicos da relação parasito-hospedeiro.

A sintomatologia não é característica e praticamente todas as síndromes neurológicas podem estar presentes, sendo frequentes convulsões, hipertensão intracraniana, hidrocefalia, demência, meningite, paraparesias, isoladas ou associadas, além de manifestações psiquiátricas.

Os aspectos clínicos dependem do número, tamanho, idade, vitalidade, localização, estágio de evolução do parasito e seus processos reacionais sobre o hospedeiro, além da resposta imune-inflamatória do hospedeiro. As características evolucionais do parasito em conjunto com a resposta imune-inflamatória do hospedeiro podem ser reveladas pelos exames de imagem e do LCR. A letalidade é maior nos casos de hipertensão intracraniana, associados ou não a convulsão.

Uma classificação utilizada na clínica da NC baseia-se na distribuição e características das lesões (parasito + resposta de defesa tecidual): a forma *inativa*, na qual predominam sequelas de calcificações e fibrose e os fenômenos de imunidade e inflamação são mínimos; e a *ativa*, caracterizada por intensa atividade celular nas lesões com exacerbação da sintomatologia e da resposta imune.

Em nosso meio, a letalidade observada na neurocisticercose deve-se, geralmente, aos casos de hipertensão intracraniana.

A distribuição da cisticercose é universal, sendo frequente no México, Ásia, África, Américas Central e do Sul e em outras regiões com baixas condições sanitárias. Autoridades sanitárias de países industrializados que recebem imigrantes de áreas endêmicas também têm mostrado preocupação com a cisticercose.

No Brasil, os estudos epidemiológicos da NC são realizados em instituições de ensino e pesquisa médica e apontam para frequências de até 7,5%, ressaltando o alto custo dos atendimentos e impacto de morbidade. Indivíduos entre 21 e 40 anos, economicamente ativos, correspondem à maioria dos casos, sem diferença quanto ao sexo.

Os dados de cisticercose animal, em particular a suína, são pouco confiáveis, entendendo-se que os animais doentes são afastados dos frigoríficos inspecionados, mas podem ser encaminhados para locais clandestinos de distribuição.



## ► Diagnóstico da neurocisticercose

O diagnóstico da NC é fundamentado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, incluindo os exames de imagem, como tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM).

O diagnóstico clínico da neurocisticercose é dificultado pela sintomatologia polimórfica e inespecífica e quase sempre necessita de exames complementares para determinar a etiologia. Os exames de imagem, tomografia axial computadorizada e ressonância magnética nuclear permitem a visualização de estruturas do parasito e do processo reacional do hospedeiro.

É possível que as infecções do SNC sejam acompanhadas de alterações extracelulares que podem ser investigadas no LCR, que reflete essas alterações. O exame do LCR fornece alguns dados úteis no direcionamento da suspeita clínica da NC. A pleocitose, aumento do número de leucócitos, é geralmente discreta; a presença de eosinófilos também pode ocorrer em outros processos patológicos do SNC; e a alteração no padrão de eletroforese de proteínas é do tipo verificado em processos inflamatórios subagudos e crônicos do SNC, com aumento de gamaglobulina. Essas alterações não são específicas da NC ou podem estar ausentes na vigência da infecção. Anticorpos específicos podem ser detectados por vários testes, mas aqueles mais sensíveis, como o teste imunoenzimático ELISA, são recomendáveis e amplamente utilizados.

### ■ Diagnóstico por imagem

Os exames de imagem, tomografia axial computadorizada e ressonância magnética nuclear, auxiliam o diagnóstico da NC pela visualização de estruturas compatíveis com o parasito, bem como fornecem informações sobre a atividade, a natureza e a intensidade das respostas inflamatória e imunológica.

Antes do advento desses recursos, o parasito só podia ser visualizado em radiografias, na forma calcificada, que pode aparecer anos após a infecção e é inespecífica.

As imagens da NC na TC podem não ser específicas e a RM é técnica mais sensível e específica, por permitir diagnóstico mais precoce, definição mais exata e representação detalhada do processo inflamatório, diferenciando os estágios de evolução da infecção parasitária desde cistos vivos, início da fase de degeneração, hialinização, fibrose e calcificação.

### ■ Métodos imunodiagnósticos

Os métodos imunológicos de diagnóstico da NC têm sido amplamente aplicados, já que, em função da localização do parasito, há restrições para o diagnóstico direto.

A imunidade celular específica na NC vem sendo estudada com interesse na compreensão da relação parasito-hospedeiro e não com finalidade diagnóstica. A intradermoreação, como método diagnóstico da NC, pela baixa sensibilidade, inespecificidade e pelos riscos de desencadear resposta de hipersensibilidade, imediata (anticorpos IgE) ou tardia (imunidade celular), não pode ser utilizada.

Já a imunidade humoral tem sido amplamente investigada e a detecção de anticorpos específicos anticisticercos em LCR vem sendo considerada um dos elementos de certeza diagnóstica da infecção. O mesmo teste aplicado a amostras de soro pode incluir resultados falso-positivos por reações cruzadas entre antígenos de diversos parasitos, comuns em nosso meio.

Desde Lange, em 1940, que utilizou o teste de imunofixação de complemento (reação de Weinberg), vários autores padronizaram inúmeras variedades de imunoensaios para pesquisa de anticorpos no diagnóstico laboratorial da cisticercose. Esses métodos incluíram testes de imunoprecipitação, aglutinação, imunofluorescência e até o teste imunoenzimático ELISA.

Ao longo do tempo, foram inseridos métodos de purificação dos extratos antigênicos, buscando maior especificidade dos testes em amostras de soro.

A literatura é rica em informações detalhadas desses testes, especialmente entre as décadas de 1970 e 1990. A sensibilidade e especificidade desses testes eram superiores a 95% em amostras de LCR, as quais são obtidas na fase de maior reatividade imune do hospedeiro, ou seja, quando há sintomas. Esses índices também eram elevados em amostras de soro, com desvantagem para a especificidade que podia ser tão reduzida quanto 80%.

Nos últimos anos considera-se recomendável na investigação laboratorial da cisticercose: utilizar os testes imunoenzimáticos ELISA na triagem sorológica e o *immunoblot* como teste suplementar para verificar especificidade dos anticorpos detectados no teste de triagem.

### Teste imunoenzimático ELISA

O teste ELISA tem sido o mais estudado no imunodiagnóstico da NC pela elevada sensibilidade de seus resultados, e com vantagens de especificidade para o uso do LCR como amostra de investigação. O teste foi introduzido na década de 1980, sempre realizado em instituições médicas de ensino e pesquisa ou em laboratórios a elas ligados.

O uso de componentes do parasito como antígeno mostrou que o líquido vesicular apresenta elevada antigenicidade e é bastante específico, o que tornou esse antígeno alvo de purificações adicionais, bem como caracterização dessas frações obtidas.

### Immunoblot

O *immunoblot* tem sido utilizado no estudo da NC observando-se diferentes índices de sensibilidade e eficiência, muitas vezes em função da preparação antigênica, do tipo e gravidade das lesões e da reação inflamatória envolvendo o parasito.

Foi utilizado com sucesso por pesquisadores americanos dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) que desenvolveram o *immunoblot* para diagnóstico da cisticercose em soros e LCR, utilizando antígeno de glicoproteínas de cisticercos de *Taenia solium* obtidas por cromatografia de afinidade em lentil-lectina acoplada a Sepharose 4B (lentil lectin Sepharose®). Obtiveram especificidade de 100% e sensibilidade de 98%. Sete glicopeptídios (50, 42 a 39, 24, 21, 18, 14 e 13 kDa) foram reconhecidos. Infelizmente, o teste não foi comercializado em larga escala para uso nos países onde a cisticercose é endêmica.

### Pesquisa de antígenos

A pesquisa de antígenos ampliaria as perspectivas de diagnóstico da NC, elevando sua sensibilidade, já que os antígenos parasitários, principalmente de excreção e secreção, apareceriam no LCR antes da produção de anticorpos. No entanto, esses métodos não puderam ser adequadamente padronizados e avaliados. O recurso sofisticado dos exames de imagem, principalmente a RM, torna menos importante o uso de outros testes laboratoriais.



## ► Considerações finais

A neurocisticercose é a forma mais frequente e grave de infecção por cisticercos de *Taenia solium*, sendo a mais estudada das doenças parasitárias do SNC.

A evolução longa afeta a qualidade de vida do paciente com reflexos socioeconômicos, considerando o elevado tempo de permanência hospitalar, o alto custo da doença e os doentes em idade produtiva, frequentemente afastados de suas atividades a partir do início dos sintomas neurológicos.

O imunodiagnóstico laboratorial da neurocisticercose tem especial importância em função dos aspectos polimórficos dos sinais e sintomas e do modelo crônico repetitivo com surtos de agudização com que a doença se manifesta.

Em nosso meio, tem sido utilizado preferencialmente o LCR como espécime de estudo, de elevado valor diagnóstico, particularmente na detecção de anticorpos.

Ao elaborar um teste em que se pesquisam anticorpos específicos, deve-se considerar a diversidade genética do hospedeiro e as variações temporais na evolução do parasito e da própria infecção. Assim, a probabilidade de se encontrar uma fração ou epitopo antigênico universalmente reconhecido por todos os hospedeiros durante todo o tempo da infecção deve ser mínima. Também é necessário conhecer a cinética da resposta imune para que se elaborem testes com valor prognóstico da doença.

Atualmente, os testes imunológicos para cisticercose estão restritos a centros de pesquisa, com pouca oferta de reagentes comercializados.

Vários métodos imunológicos já foram aplicados no imunodiagnóstico da cisticercose, usando a pesquisa de anticorpos. Avaliações comparativas indicam o teste imunoenzimático ELISA, o qual apresenta maior eficiência diagnóstica por utilizar antígenos purificados. Variados métodos têm sido usados na purificação desses antígenos: deslipidização, cromatografia de focalização isoeletrica, purificação em colunas de imunoafinidade com anticorpos monoclonais e cromatografia de exclusão molecular.

Quando os reagentes são adquiridos comercialmente de empresas estrangeiras, será necessária a validação do ensaio empregando amostragem que represente a população em que o teste será executado. Isso vale especialmente quando são utilizadas amostras de soro.

Para fins de pesquisa, são mantidos a área de investigação, o estudo de antígenos adequados e em quantidade suficiente para garantir homogeneidade e controle de qualidade, uma vez que suínos com infecção natural, frequentemente mantidos na clandestinidade, são de difícil manipulação experimental. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos poderiam ser utilizados como antígenos, mas ainda estão em fase inicial de estudos.

## ► Bibliografia

- Agapejev S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1996; 38:207-216.
- Bueno EC, Schell CM, Vaz AJ *et al.* Application of synthetic 8kDa and recombinant gp50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by ELISA. *Am J trop Med Hyg* 2005; 72:728-733.
- Carpio A. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:751-762.
- Chung Jy, Bahk YY, Huh S *et al.* A recombinant 10kD protein on *T. solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1999; 180: 1307-1315.
- Del Brutto OH, Sotelo J. Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* 1988; 10:1075-1087.
- Espindola NM, Iha AH, Fernandes I *et al.* Immunodiagnosis of cysticercosis using 18-kDa and 14-12-kDa proteins from *T. crassiceps* cysticerci antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3178-3184.
- Flisser A. *Taenia solium* cysticercosis: some mechanisms of parasite survival in immunocompetent hosts. *Acta Leiden* 1989; 57:259-263.
- Garcia HH, Del Brutto OH. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14:97-119.
- Greene RM, Hancock K, Wilkins PP *et al.* *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol* 2000; 86: 1001-1007.
- Lange O. Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meningea. *Rev Neurol Psiquiatr* 1940; 6:35-48.
- Livramento JA. Síndrome do líquido cefalorraqueano na neurocisticercose. *Arq Neuro-Psiquiatr* 1987; 45:261-275.
- Livramento JA, Machado LR, Spina-França A. Sinalização do líquido cefalorraqueano em doenças inflamatórias crônicas do SNC. *Arq Neuro-Psiquiatr* 1986; 44:351-358.
- Machado LR, Nobrega JPS, Barros NG *et al.* Computed tomography in neurocysticercosis. A 10-long year evolution analysis of 100 patients with na appraisal of new classification. *Arq Neuropsiquiatr* 1990; 48:414-418.
- Machado LR. Líquido cefalorraqueano e neurocisticercose – aspectos evolutivos da resposta inflamatória celular. *Arq Neuro-Psiquiatr* 1987; 45:353-363.
- Rey L. Cisticercose humana. In: Rey L, ed. *Bases da parasitologia médica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002; p. 208-219.
- Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. *Arch Intern Med* 1985; 145:442-445.
- Spina-França A, Livramento JA, Machado LR. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1962). *Arq Neuro-Psiquiatr* 1993; 51:16-20.
- Spina-França A. Patogenia das infecções do SNC e LCR. Análise crítica da contribuição diagnóstica. *Rev Paul Med* 1989; 107:169-174.
- Takayanagui OM. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Neurology* 1998; 50: 834-835.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Inf Dis* 1989; 159:50-59.
- Vaz AJ. Diagnóstico imunológico das parasitoses. In: De Carli GA, ed. *Parasitologia clínica: seleção e uso de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007; p. 539-576.
- White Jr AC. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis* 1997; 24:101-115.
- Wilson M, Schantz PM, Peniazek N. Diagnosis of parasitic infections: immunologic and molecular methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1995. p. 1159-1170.



# Capítulo 31

---

## Toxocaríase

*Guita Elefant,  
Cristina Miuki Abe Jacob,  
Edite Hatsumi Y. Kanashiro e  
Benedito Anselmo Peres*

- Introdução, 352
- Gênero *Toxocara*, 352
- Epidemiologia, 352
- Manifestações clínicas, 353
- Alterações laboratoriais, 354
- Tratamento, 354
- Diagnóstico, 355
- Perspectivas, 360
- Referências bibliográficas, 360



## ► Introdução

A toxocaríase é uma das mais importantes zoonoses em nosso meio e, mesmo assim, sua real prevalência no Brasil ainda não está completamente determinada, uma vez que os estudos epidemiológicos disponíveis foram realizados apenas em comunidades bem definidas. Embora bastante comum no país devido às condições ambientais observadas, muitos casos permanecem não diagnosticados. O fato de a infecção por *Toxocara* ser frequentemente assintomática ou com leves manifestações clínicas pode também contribuir para essa realidade.

Beaver, em 1952, foi o primeiro investigador a caracterizar a doença, denominando-a síndrome da larva *migrans* visceral (SLMV), a qual acometia crianças com sintomas pulmonares, hepatomegalia e eosinofilia crônica.<sup>1</sup> Desde sua descrição, vários conceitos foram estabelecidos, até que, em 1969, Beaver<sup>2</sup> definiu a SLMV como a migração e persistência de larvas vivas, por períodos prolongados, em tecidos de hospedeiros não habituais. Segundo esses conceitos, ficam excluídos da SLMV agentes como *Dirofilaria* e outros filarídeos, *Angiostrongylus*, *Capillaria*, *Lagochilascaris*, bem como outros nematódeos dos quais o homem se caracteriza mais como hospedeiro final do que intermediário ou paratênico.

Diversos agentes têm sido propostos como causadores da SLMV em humanos, sendo mais citadas as espécies do gênero *Toxocara*, *Gnathostoma spinigerum* e *Ancylostoma caninum*.<sup>3</sup> Mais recentemente também o *Toxocara pteropodis*, um parasito de morcegos frugívoros, tem sido apontado como agente da SLMV em humanos.

Entre as espécies do gênero *Toxocara*, o *Toxocara canis* (*T. canis*) é, sem dúvida, o agente que mais comumente se relaciona com SLMV, tendo sido localizado em várias ocasiões em tecidos de pacientes com manifestações clínicas compatíveis com SLMV (Beaver *et al.*, 1952).<sup>1</sup>

## ► Gênero *Toxocara*

O gênero *Toxocara* pertence ao filo Nematelminthes, classe Nematoda, ordem Ascaroidea, família Ascaridae e subfamília Ascarinae. Compõe-se de 21 espécies, sendo as mais relacionadas com a SLMV a *Toxocara canis*, a *Toxocara cati* e a *Toxascaris leonina*. Entre essas espécies, a *T. canis* se destaca pelas peculiaridades do ciclo biológico e padrão de migração larvária, características que conferem ao parasito a capacidade de ser o agente mais frequentemente implicado na etiologia da SLMV.

O principal hospedeiro do *T. canis* é o cão, porém outros animais já foram descritos albergando esse parasito, entre eles gato, raposa, guepardo, tigre e roedores. O homem também já foi descrito como portador do verme adulto no intestino.<sup>4</sup>

O reservatório típico do *T. canis* é o cãozinho menor de 10 semanas de idade, pois praticamente todos os filhotes são infectados por transmissão larvária transplacentária.

O meio de aquisição de infecção pelo cão pode ocorrer de várias maneiras:

- Ingestão do ovo infectante
- Ingestão da larva em tecidos de hospedeiros paratênicos
- Migração transplacentária
- Passagem da larva pelo colostro
- Ingestão de L5 (larva de 5º estágio) pela cadela, quando da higienização dos filhotes.

A idade dos cães parece interferir na rota de migração preferencial das larvas, sendo que nos animais menores de 5 semanas de idade desenvolve-se a rota traqueal, e em animais mais velhos, a somática.

A mobilização de larvas dos tecidos pode ocorrer, por ocasião da prenhez da cadela, por provável ação hormonal. A transmissão transplacentária é de extrema importância epidemiológica, já que grande parte dos filhotes nasce infectada, com alta capacidade de contaminação ambiental e disseminação da infecção.

A aquisição de infecção pelo homem pode ocorrer de várias maneiras: ingestão do ovo infectante, ingestão da larva em tecidos de hospedeiros paratênicos e ingestão de L5.

O contato do homem, principalmente crianças, com solo contaminado é um dado relevante. Um fator de risco claramente associado à aquisição da infecção por *T. canis* é a geofagia, que leva à ingestão de material contaminado com ovos infectantes.

Beaver, em 1966, já sugeria outro meio de aquisição da infecção pela possível transferência da larva do *T. canis* entre hospedeiros paratênicos. Esse fato foi confirmado posteriormente, a partir de relatos de manifestações clínicas da SLMV em pacientes que ingeriram fígado cru para tratamento de anemia perniciosa e também pela identificação de larva do *T. canis* em tecidos de vários animais ingeridos pelo homem. A descrição de achados de vermes adultos em humanos pode ser explicada pela ingestão da larva L5, que completaria sua maturação no homem.<sup>5</sup>

Uma vez ingerido, o ovo embrionado libera a larva no estômago e no intestino delgado, a qual penetra a mucosa intestinal, invade as correntes linfática e sanguínea, alcançando todos os tecidos. Essa larva pode permanecer quiescente por períodos prolongados ou produzir manifestações clínicas variadas, dependendo de sua localização.<sup>5</sup>

## ► Epidemiologia

O tamanho da população canina de uma região e a contaminação do solo por ovos infectados são fatores preponderantes para a aquisição da infecção por *T. canis*.

A prevalência de cães acometidos por este parasito varia de 0 a 93%, com média de 15,8%, sendo que em cães menores de 1 ano é encontrado alto grau de parasitismo. Estudos realizados em várias cidades do Brasil têm encontrado taxas elevadas de parasitismo canino, com prevalência de até 44,3% no município de Londrina (PR). A presença de cães, principalmente filhotes, no domicílio e o contato profissional com cães são considerados fatores de risco para a toxocaríase.

A contaminação do solo por ovos de *T. canis* é bastante elevada, sendo que, em nosso meio, Chieffi e Muller encontraram positividade de 60% em amostras colhidas no município de Londrina.<sup>6-9</sup>

Os ovos de *T. canis* são muito resistentes a fatores hostis, podendo permanecer por tempo prolongado em solo argiloso, com temperaturas entre 15 e 35°C. Após o embrionamento, tornam-se infectantes, podendo contaminar seres humanos, principalmente crianças, quando ingeridos. O hábito da geofagia, bastante comum em crianças menores de 5 anos de idade, é um fator epidemiológico importante, sendo este um achado frequente na população pediátrica.<sup>6</sup> A capacidade de permanecer no solo por longos períodos e a dispersão aérea dos ovos podem ser fatores que influenciam tais dados epidemiológicos. Outra maneira de contrair a infecção é a ingestão de carne crua ou mal cozida contaminada pela larva do parasito.<sup>10,11</sup>



Após o aperfeiçoamento de técnicas sorológicas para o diagnóstico de infecção por *Toxocara*, em especial pela metodologia de ELISA, foi possível a comparação entre inquéritos epidemiológicos para melhor conhecimento da toxocaríase.

O índice de positividade da sorologia para *Toxocara* (ELISA), segundo vários autores, apresenta grande variabilidade, sendo descritas taxas de até 92,8%.<sup>12-19</sup> Em nosso meio, inquérito epidemiológico realizado por Chieffi *et al.*<sup>20</sup> encontrou positividade de 3,72% e Alderete *et al.*,<sup>21</sup> avaliando escolares do subdistrito do Butantã, em São Paulo, encontraram soropositividade de 38,8%.

Recentemente, outros estudos avaliaram a frequência da positividade da sorologia em populações brasileiras, sendo encontradas taxas de 26,8% no Acre, por Elefant *et al.*,<sup>22</sup> 21,5% em Teodoro Sampaio (BA), por Prestes-Carneiro *et al.*<sup>23</sup> e 18,9% em Goiânia (GO) por Santos *et al.*<sup>24</sup> Sob esse aspecto, a contribuição de pesquisadores brasileiros tem sido bastante significativa, com aumento das publicações nacionais sobre a doença, conforme descrito por Chieffi *et al.* (2009).<sup>25</sup>

## ► Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da toxocaríase são bastante variadas, desde casos assintomáticos até aqueles com evolução fatal e que parecem depender de vários fatores, tais como a quantidade da carga parasitária, a distribuição das larvas, o padrão de migração larvária e a resposta imune do hospedeiro. A ocorrência de reinfecções, com estímulos constantes na imunidade do hospedeiro, também pode ser um fator modulador da sintomatologia clínica.

As manifestações clínicas são consequentes ao parasito nos tecidos do hospedeiro, produzindo reações inflamatórias e de hipersensibilidade no órgão acometido. Atualmente, são descritas diversas maneiras de apresentação clínica da doença, tais como toxocaríase visceral, toxocaríase ocular, toxocaríase oculta (*covert toxocariasis*) e outras formas atípicas.

### ■ Toxocaríase visceral

A toxocaríase visceral (TV) acomete principalmente crianças de 1 e 5 anos de idade, embora haja descrição da doença em todas as idades. A associação a dados epidemiológicos característicos é bastante significativa, embora sua ausência não exclua a síndrome.<sup>26</sup>

As manifestações clínicas mais frequentes na TV são: anemia, febre, hepatomegalia e manifestações pulmonares, porém são também relatados outros achados clínicos, como: manifestações neurológicas, edema, artrite, eritemas fugazes e nódulos subcutâneos.<sup>27-29</sup> Casos graves ou fatais geralmente são decorrentes de extenso envolvimento miocárdico e do sistema nervoso central e/ou resposta exacerbada do hospedeiro. Os achados mais comuns encontrados ao exame físico são citados no Quadro 31.1.

*Manifestações cutâneas* têm sido frequentemente associadas à TV e podem se expressar de diferentes maneiras. Entre as manifestações cutâneas, destacam-se o prurigo crônico, a urticária crônica e diferentes apresentações de eczema.<sup>30</sup>

► **Prurigo crônico.** A associação entre a existência de prurigo crônico, que é uma entidade clínica caracterizada por prurido intenso, liquenificação e pigmentação, tem sido associada à positividade da sorologia para *Toxocara*. Esse achado clínico é citado em literatura, sendo que Humbert *et al.* (2000),<sup>31</sup> em

**Quadro 31.1 • Achados de exame físico em pacientes com toxocaríase visceral.**

Achado de exame físico	Snyder <sup>43</sup> (1961) (n=20)	Huntley <i>et al.</i> <sup>34</sup> (1965) (n=51)	Ehrhard e Kernbaun <sup>47</sup> (1979) (n=350)	Jacob <i>et al.</i> <sup>28</sup> (1994) (n=40)
Febre	55%	80%	69,3%	15%
Hepatomegalia	85%	65%	74,6%	50%
Palidez	40%	NR	26,2%	70%
Ausulta pulmonar anormal	20%	43%	66,7%	60%
Esplenomegalia	45%	NR	32,9%	20%
Adenomegalia	NR	8%	21,2%	15%

NR = não referido.

estudo tipo caso-controle, encontraram 38,1% de positividade da sorologia nesses pacientes. Em comparação com o grupo controle, foi encontrada associação estatisticamente significativa no grupo citado. Em contraste, esses mesmos autores não encontraram associação entre a positividade da sorologia e a existência de prurigo crônico.

Os principais mecanismos imunológicos para explicar a associação com o prurigo crônico são atribuídos à ativação de eosinófilos decorrente da liberação de fatores quimiotáticos e estimuladores da degranulação dessas células no local da lesão. Outra possibilidade poderia ser o efeito pruriginoso da própria larva, à semelhança da observação com larvas de *Ascaris suum*.

► **Urticária crônica (UC).** A UC é uma das doenças de diagnóstico mais difícil, sendo descritas possíveis etiologias. Entre elas, a toxocaríase tem sido cada vez mais citada por vários autores. Wolfrom *et al.*, avaliando uma população com manifestações dermatológicas, encontraram 65% dos pacientes com UC apresentando sorologia positiva para *Toxocara*, sendo essa associação estatisticamente significativa.<sup>32</sup> Outros estudos confirmaram essa associação. Em contraste, em estudos realizados em pacientes com urticária aguda, essa associação não foi confirmada.<sup>31</sup> Deve ser ressaltado que a UC tem sido observada nos pacientes com toxocaríase oculta, que poderia representar mais uma patologia mostrando a associação entre UC e agentes infecciosos, incluindo parasitoses teciduais. Outro fato que confirma a associação é a melhora dos pacientes com UC após tratamento anti-helmíntico. Por todas essas evidências, diversos autores recomendam a pesquisa de toxocaríase em pacientes com UC, em especial naqueles com falta de resposta ao tratamento com anti-histamínicos e com condições ambientais propícias, tais como contato com cães, ambientes rurais e condição socioeconômica desfavorável.<sup>33</sup>

► **Eczema.** Muitas apresentações de eczema têm sido associadas à toxocaríase, incluindo dermatite atópica e disidrose, mas, até o momento, faltam evidências consistentes para a confirmação dessa associação. A concomitância de ambos os fenômenos é possível, no entanto, sem relação de causa e efeito.

Outras manifestações dermatológicas menos comuns têm sido associadas à toxocaríase, mas são apenas relatos de casos na literatura. Lesões granulomatosas subcutâneas associadas à eosinofilia têm sido descritas, assim como paniculite migratória, vasculites e foliculite eosinofílica.<sup>31</sup>



**Manifestações pulmonares** são frequentemente descritas nas crianças com toxocaríase, desde a descrição inicial de Beaver em 1952.<sup>1</sup> Diversas manifestações pulmonares têm sido associadas à infecção por *Toxocara*, entre elas: tosse crônica, broncospasmo recidivante e mais raramente insuficiência respiratória associada a pneumonia eosinofílica aguda.<sup>34,35</sup>

A infecção pela larva do *Toxocara* também tem sido associada à predisposição ao desenvolvimento de asma, o que tem sido demonstrado por meio de alguns estudos epidemiológicos.<sup>36,37</sup> Como ambas as doenças são muito prevalentes em nossa população, alcançando entre 10 e 30%, a real relação de causa e efeito entre elas é difícil de ser confirmada. Na prática clínica, em crianças com broncospasmo recidivante e condições ambientais propícias ao desenvolvimento de toxocaríase, essa doença deve ser sempre pesquisada, em especial naqueles pacientes com outras manifestações sistêmicas e hipereosinofilia.

O envolvimento do sistema nervoso tem sido evidenciado pelo achado de convulsões, meningoencefalite, síndrome de Guillain-Barré e distúrbios de comportamento.<sup>38,39</sup>

### ■ Toxocaríase ocular

A toxocaríase ocular (TO) foi inicialmente reconhecida em olhos enucleados por suspeita de retinoblastoma, nos quais foram detectadas larvas de *Toxocara canis*. A síndrome da toxocaríase ocular acomete, principalmente, crianças maiores de 6 anos. Tipicamente, faltam as manifestações clínicas encontradas na forma visceral. O quadro clínico se restringe ao olho e deve ser distinguido de outras patologias oculares da faixa etária pediátrica, tais como: retinoblastoma, doença de Coats, toxoplasmose e tuberculose.<sup>28,40-42</sup>

As lesões oculares associadas à toxocaríase são: granuloma retiniano, endoftalmite, catarata, queratite e papilite óptica. As queixas clínicas mais referidas pelos pacientes são: comprometimento visual, dor e hiperemia oculares, não raro, associados ao estrabismo.<sup>28</sup>

O quadro laboratorial que acompanha a TO é pobre, inclusive pela baixa resposta humoral, decorrente do insuficiente estímulo imunológico em vista do reduzido número de larvas.<sup>42</sup>

O diagnóstico, geralmente, baseia-se na sorologia por ELISA com antígeno de *T. canis*, já que outras alterações laboratoriais são escassas. Na interpretação dessa sorologia, devem-se tomar, como significativos da infecção, títulos inferiores aos que são encontrados na forma visceral.

### ■ Formas atípicas

Com manifestações clínicas inespecíficas, tais como dor abdominal recorrente, cefaleia, astenia e hepatomegalia, têm sido observadas as chamadas formas atípicas ou “ocultas” (*covert toxocaríase*). Nessa apresentação clínica, a eosinofilia pode estar ausente, apesar de altos títulos sorológicos para *Toxocara*. Outra apresentação atípica relatada atinge, principalmente, o adulto jovem, do sexo feminino, que apresenta astenia crônica, erupção cutânea e dor no hipocôndrio direito. Na maioria dos casos, há detecção de elevados níveis de gamaglutamiltranspeptidase, associados a níveis também elevados de anticorpos anti-*Toxocara*.<sup>43-45</sup>

### ► Alterações laboratoriais

As alterações laboratoriais características da TV são: leucocitose, eosinofilia maior ou igual a 20%, hipergamaglobulinemia e elevações dos títulos de iso-hemaglutininas anti-A

e anti-B. Jacob *et al.* relatam que a utilização de um índice percentual pode ser menos sensível que o valor absoluto de 2.000 eosinófilos/mm<sup>3</sup> para o critério diagnóstico da TV.<sup>27,28</sup> Deve ser ressaltado que apresentações atípicas podem cursar sem aumento do número de eosinófilos, o que não exclui o diagnóstico.

Elevações dos níveis de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgE) são encontradas em até 77% dos pacientes com TV e representam a estimulação policlonal causada pelo parasito. Anticorpos anti-IgG humanos (fator reumatoide), quando avaliados pela técnica de látex, podem ser positivos em até 44% dos casos.<sup>46</sup>

O protoparasitológico é caracteristicamente negativo, já que o parasito não completa seu ciclo no homem. Apenas em raras ocasiões se detectou verme adulto em humanos.

O nível de hemoglobina nos pacientes com TV é baixo, com valores menores que 11 g/dl em 65% dos pacientes referidos por Jacob *et al.* (1987).<sup>27</sup> Evidentemente, deve-se ter cuidado ao atribuir o achado de anemia apenas à toxocaríase, já que, em geral, as condições socioeconômicas desses pacientes também são fatores de risco para o desenvolvimento de anemia ferropriva. As enzimas hepáticas estão raramente alteradas na toxocaríase, com elevações discretas das transaminases e em algumas apresentações atípicas são descritos níveis elevados de gamaglutamiltranspeptidase.

### ► Tratamento

Os casos assintomáticos não devem ser tratados, independentemente dos níveis sorológicos, já que não têm importância do ponto de vista epidemiológico.

Os pacientes com manifestações clínicas da doença e/ou de eosinofilia persistente têm indicação de tratamento, uma vez que o número elevado de eosinófilos pode causar efeitos deletérios ao paciente.

Quando indicado, o tratamento pode ser dividido em sintomático e anti-helmíntico. O tratamento sintomático visa atenuar os sintomas decorrentes da resposta inflamatória à larva ou aos seus metabólitos. Corticosteroides, anti-histamínicos e broncodilatadores têm sido utilizados e podem ser bastante úteis na fase aguda da TV.

O tratamento anti-helmíntico utiliza diversos medicamentos com o objetivo de reduzir a carga parasitária tecidual. Sua eficácia, no entanto, é duvidosa, e o real benefício do seu emprego ainda permanece em discussão. Entre os fármacos mais utilizados estão: tiabendazol, dietilcarbamazina, mebendazol, albendazol, fenbendazol, flubendazol, oxfendazol e ivermectina.<sup>48,49</sup> Em nosso meio, tem sido utilizado o tiabendazol na dose de 25 mg/kg/dia, por 7 dias, e repetido após intervalo de 1 semana. Efeitos colaterais devem ser monitorados, tais como dor abdominal, icterícia e avaliação de enzimas hepáticas.<sup>28,29</sup>

Recentemente, uma preparação de albendazol em microesferas está sendo testada em animais de experimentação para avaliar se há redução importante do número de larvas nos tecidos, reduzindo assim o risco de disseminação para órgãos nobres como o cérebro. Em estudo experimental, parece haver importante redução de larvas em tecido pulmonar e menor capacidade de migração de larvas para o sistema nervoso central.<sup>50</sup> Embora promissora, esta substância ainda necessita ser melhor estudada para uso em humanos.



Medidas preventivas são de especial importância e devem sempre complementar o tratamento medicamentoso. Assim, o tratamento de cães parasitados e a orientação quanto ao hábito de geofagia são medidas imprescindíveis no tratamento eficaz da toxocaríase.

## ► Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da toxocaríase pode ser realizado pelo encontro da larva em tecidos do hospedeiro, porém mesmo em biopsia hepática este achado é raro e, por ser um método invasivo, não é recomendado, necessitando assim de outros meios laboratoriais para o diagnóstico da doença.

Exames radiológicos, como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, podem auxiliar na localização de lesões granulomatosas devidas às larvas de *Toxocara*.<sup>51</sup>

## ▪ Diagnóstico imunológico

As limitações das técnicas de diagnóstico parasitológico para a toxocaríase humana, desde o reconhecimento inicial da doença, estimularam numerosas investigações com o objetivo de desenvolver métodos práticos e precisos de imunodiagnóstico para detectar anticorpos específicos no soro, nos fluidos oculares ou mesmo em líquido cefalorraquidiano do paciente infectado.

Diversos métodos foram descritos e utilizados no passado, tais como a intradermorreação ou reações sorológicas de fixação do complemento, floculação de bentonita, testes de precipitação da larva ou de seus antígenos em gel de ágar, hemaglutinação indireta, imunofluorescência direta ou indireta, radioimunoensaio e testes imunoenzimáticos.<sup>12</sup> Os antígenos utilizados nessas reações incluem extratos somáticos de vermes adultos, de ovos embrionados, de larvas íntegras ou seccionadas e produtos metabólicos coletados *in vitro*. Após a padronização da sorologia para detecção de anticorpos IgG, pelo teste imunoenzimático (ELISA) utilizando antígeno de excreção e secreção de larva de *T. canis* (TES), foi possível a realização de inquéritos soroepidemiológicos comparativos. O teste ainda é hoje o mais amplamente utilizado.<sup>52-54</sup>

Em relação à IgM específica, os níveis permanecem elevados durante infecção crônica tanto em estudos experimentais em cães<sup>18</sup> como em humanos,<sup>55</sup> mostrando que a resposta de IgM não é transitória na toxocaríase humana, não sendo possível, por meio de sua detecção, definir o tempo decorrente de infecção. Como marcador de infecção ativa, a detecção de proteína catiônica eosinofílica tem sido recomendada.<sup>56</sup>

## Antígeno

O antígeno apropriado para uso em testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. no homem ou outro hospedeiro paratênico deve ser derivado de larva infectante, pois é mais sensível e específico que os antígenos de vermes adultos. O antígeno de escolha tem sido o TES, obtido *in vitro*, a partir de larvas mantidas por vários meses em meio de cultura definido, isento de macromoléculas. Esse antígeno é altamente imunogênico e, portanto, muito utilizado em estudos soroepidemiológicos e no diagnóstico sorológico da toxocaríase.<sup>57</sup>

Estudos mostram que o TES é composto por diferentes glicoproteínas excretadas pela larva e também liberadas de

sua superfície. O rendimento e a composição desse antígeno podem variar, segundo detalhes técnicos de manutenção das larvas ou, mesmo, de sua procedência. A remoção prévia de proteases parece ser importante e pode ser efetuada por meio de lavagens das larvas após sua eclosão, impedindo assim que contaminem o produto antigênico.<sup>58</sup>

A partir dos processos de marcação com radioisótopos, suscetibilidade enzimática, ligação a lectinas e espectrofotometria de massa, tem sido possível definir os componentes proteicos e glicídicos presentes na estrutura do antígeno TES. As cinco principais moléculas são classificadas de acordo com suas aparentes massas moleculares em quilodáltons (kDa): TES-32, 55, 70, 120 e 400, determinadas por eletroforese em gel de poliácridamida.<sup>59</sup>

O TES-32 é N-glicosilado, como indicado por sua sensibilidade para a enzima N-glicanase, que reduz sua massa molecular para 26 kDa. Liga-se à concanavalina A e à aglutinina do germe de trigo. Sua expressão na superfície da larva infectante é evidenciada pela utilização de anticorpo monoclonal e microscopia eletrônica.

Os TES-55 e TES-70 são glicoproteínas associadas à superfície da cutícula do parasito. O TES-70 está associado à fração lipídica da epicutícula da larva e é muito reativo com os anticorpos antigro grupo sanguíneo.

As técnicas de marcação e incorporação de metionina radioativa permitiram verificar que o TES-120 é um produto proteico predominante da larva. É resistente à degradação pela tripsina e pela protease V8 de estafilococo e suscetível à ação da enzima pronase.

O TES-400 é um grupo de bandas de alta massa molecular que contém as seguintes propriedades: é resistente à maioria das proteases e não se cora pelos métodos que utilizam o azul de Coomassie ou a prata para identificar proteínas, mas sim pelo reagente de Schiff, que responde unido aos carboidratos; os estudos das propriedades físico-químicas excluem a possibilidade de ser um agregado ou uma forma agrupada de produtos de baixa massa molecular.<sup>59</sup>

Todos os principais produtos são glicosilados, apresentando até 400 µg de carboidrato por miligrama de proteína. Os mais abundantes são a galactose e a N-acetilgalactosamina (açúcar imunodominante do antígeno humano do grupo sanguíneo A, contribuindo com 58% do total de carboidratos). Estudos com anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno TES, produzidos em diferentes laboratórios, evidenciam sua natureza glicoproteica. Por meio de anticorpos monoclonais pode-se detectar antígeno de *Toxocara* em soros de animal infectado e de pacientes, confirmando, assim, a liberação *in vivo* desse produto, que pode ser muito útil para o diagnóstico.<sup>60,61</sup>

Por meio do método cromatográfico de gel filtração do antígeno TES, foi possível obter duas ou sete frações, dependendo das características da resina empregada. As propriedades antigênica e alergênica do TES estavam presentes na fração inicial, excluída da coluna. O antígeno recuperado por esse processo de fracionamento foi relatado como sendo uma glicoproteína, com massa molecular de 35 kDa. Essa fração perde sua atividade alergênica quando tratada com guanidina hidrocloreto e 2-mercaptoetanol, mas retém sua habilidade de induzir a resposta imune para IgM e IgG anti-*T. canis*.<sup>62</sup>

Em função da alta reatividade antigênica com anticorpos humanos e de animais infectados e pela praticidade de sua obtenção *in vitro*, o TES é recomendado como antígeno padrão para ser utilizado nos testes de diagnóstico sorológico da toxocaríase humana. Verificou-se que o TES não contém a fosforilcolina, um determinante antigênico responsável por reações cruzadas e que está presente em outros helmintos.<sup>63</sup>



O TES também é encontrado ao redor da larva no tecido do hospedeiro paratênico e é importante para a sobrevivência do parasito *in vivo*. A larva de *T. canis* produz uma protease semelhante à elastase, e é provável que a larva a utilize, durante a migração através dos tecidos, de maneira análoga à que foi descrita para o esquistossômulo do *Schistosoma mansoni*.

Com relação ao sistema imune, o TES induz eosinofilia em camundongos, se administrado em grandes quantidades. Linfócitos T humanos respondem ao TES, por meio das células Th2, produzindo as citocinas IL-4 e IL-5. A primeira estimula as células B e amplifica a resposta de IgE; a segunda é importante para a estimulação do eosinófilo.<sup>64-66</sup> Estudos com camundongos mutantes deficientes em CD4 e camundongos normais infectados com *T. canis* sugerem que as células CD4 sejam as responsáveis pela produção da IL-4 e IL-5.<sup>67</sup> Trabalhos experimentais têm sido realizados demonstrando o papel da IL-5 na migração de eosinófilos da medula óssea para o sangue e tecidos, bem como na manutenção da eosinofilia na síndrome da larva *migrans* visceral e ainda seu papel na patologia da doença.<sup>68,69</sup> Ainda em relação aos eosinófilos, foi demonstrado que linfócitos T CD8+ de camundongos infectados pelo *T. canis* produzem fator quimiotático de eosinófilos.<sup>70</sup>

Uma protease recombinante ("cisteíno-protease catepsina L-like") de larva infectante de *T. canis* foi caracterizada. Soro de camundongos imunizados com essa protease recombinante reage especificamente com uma protease nativa de 30 kDa de extrato somático da larva. Estudos em larga escala estão sendo investigados com relação à eficácia deste possível antígeno para o sorodiagnóstico da toxocaríase humana.<sup>71</sup>

### Teste imunoenzimático ELISA

Com a introdução do teste ELISA utilizando o antígeno TES de larva de segundo estágio de *T. canis*, obteve-se uma ferramenta importante, passando a ser largamente empregada e aceita como padrão para o imunodiagnóstico. Glickman *et al.* (1986)<sup>53</sup> encontraram sensibilidade de 78,3% e especificidade de 92,3% no ELISA com antígeno TES, evidenciando a importância dessa técnica para o diagnóstico da toxocaríase.<sup>72</sup>

Para interpretar o resultado do teste, deve-se definir para cada população o limiar de reatividade. Na maioria dos ensaios, tanto para fins diagnósticos como para inquéritos soroepidemiológicos, são pesquisados anticorpos da classe G. A sorologia pode permanecer elevada por longo período, e a pesquisa de imunoglobulinas A e E tem mostrado sua importância no acompanhamento terapêutico.<sup>54,73</sup>

A aplicação dos diferentes parâmetros sorológicos é dificultada pela falta de um método parasitológico seguro que estabeleça um diagnóstico definitivo. O número de biopsias realizadas para comprovar casos humanos de TV ou TO é muito limitado para validar os estudos estatísticos. A determinação de antígeno parasitário poderia ser um teste excelente para confirmar o diagnóstico da infecção. Contudo, uma variedade de observações experimentais, clínicas e epidemiológicas, confirma indiretamente a eficiência diagnóstica do teste ELISA, empregado em diferentes laboratórios em várias partes do mundo.<sup>53</sup> A sensibilidade e a especificidade do teste para detectar e quantificar a resposta imune variam de acordo com a preparação do antígeno e com o método sorológico. Essa variação ocorre no imunodiagnóstico de doenças causadas por helmintos, um campo comumente caracterizado pelo uso de diferentes preparações antigênicas e por diversos processos sorológicos. Com relação ao TES, verificou-se que, embora pequenas diferenças qualitativas e quantitativas possam ser

demonstradas, não têm sido detectadas variações significativas quanto à eficiência diagnóstica de diferentes lotes do antígeno preparados e testados em diversos laboratórios.<sup>54</sup>

► **Especificidade.** A especificidade varia com as diferentes preparações antigênicas e com diferentes testes utilizados para o imunodiagnóstico da toxocaríase, tanto para fins clínicos como para epidemiológicos. O antígeno TES não é gênero-específico ou espécie-específico, e apresenta estrutura antigênica semelhante à de outros helmintos. Soros de animais infectados com *Ascaris suum*, *Toxocara cati* e *Toxocara pteropodis* e de pacientes com ascaridíase, filariose e strongiloidíase reagem com o antígeno TES. Por outro lado, há relatos de autores que descrevem a reatividade do TES como sendo específica para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara*. Essa divergência de resultados provavelmente decorre de diferenças entre os procedimentos técnicos utilizados. Além disso, estudos da resposta imune em animais experimentalmente infectados não refletem, necessariamente, o que ocorre na infecção natural que acomete o ser humano.<sup>72</sup>

Em um estudo sobre reatividade cruzada em infecções humanas (cisticercose, hidatidose, esquistossomose e toxocaríase) e animais imunizados, o teste ELISA, utilizando antígeno TES, apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 82,3%.<sup>74</sup>

Maneira prática para reduzir a reatividade cruzada é efetuar a absorção da amostra do soro com extrato antigênico de *Ascaris* sp. antes de ser analisada. Nesse processo, podem ser utilizados extratos somáticos de verme adulto, de larva ou de ovos embrionados, e até mesmo produto metabólico da larva do *Ascaris* sp.

Para resultados que expressem a máxima especificidade em estudos populacionais, em áreas de endemicidade variada, recomenda-se proceder à absorção dos soros com extrato antigênico dos diferentes parasitos não homólogos, que possam induzir a reatividade cruzada. Um exemplo disso é o inquérito soroepidemiológico realizado na Venezuela, para avaliar a especificidade do teste ELISA com antígeno TES. Nesse estudo, as amostras de soro foram processadas após absorção com extratos antigênicos dos seguintes parasitos: *Ascaris lumbricoides*; *Necator americanus*; *Ancylostoma duodenale*; *Trichuris trichiura*; *Enterobius vermicularis*; *Strongyloides ratti*; *Schistosoma mansoni*; *Taenia* sp.; *Dirofilaria immitis*; *Entamoeba histolytica*; *Giardia lamblia*; *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*.<sup>17</sup>

Em estudos experimentais com cães infectados com *Dirofilaria immitis*, foi observada intensa reatividade cruzada com *Toxocara canis* no teste ELISA. Pelo *immunoblot*, as frações antigênicas de 44, 57, 88 e 100 kDa de extrato bruto de *T. canis* foram reativas com soro de cães infectados com *D. immitis*.<sup>75</sup>

As larvas do *T. canis* apresentam componentes glicosilados, semelhantes a antígenos de grupos sanguíneos A e B, observando-se, em pacientes de toxocaríase, altos níveis de iso-hemaglutininas anti-A e anti-B. Entretanto, essas iso-hemaglutininas não parecem ser as responsáveis por falsos resultados positivos com o antígeno TES. A absorção de soros de pacientes de toxocaríase visceral com hemácias AB não reduziu a reatividade com o antígeno TES.<sup>76</sup>

Alguns autores têm estudado frações do antígeno TES que poderiam ser utilizadas para melhorar a especificidade do teste. Foi caracterizada uma fração do TES de 57 kDa e utilizada em ensaio de ELISA duplo-sanduíche. O teste apresentou-se específico para a toxocaríase e não demonstrou reatividade cruzada com soro de pacientes com *Ascaris lumbricoides* e *Necator americanus*.<sup>77</sup>

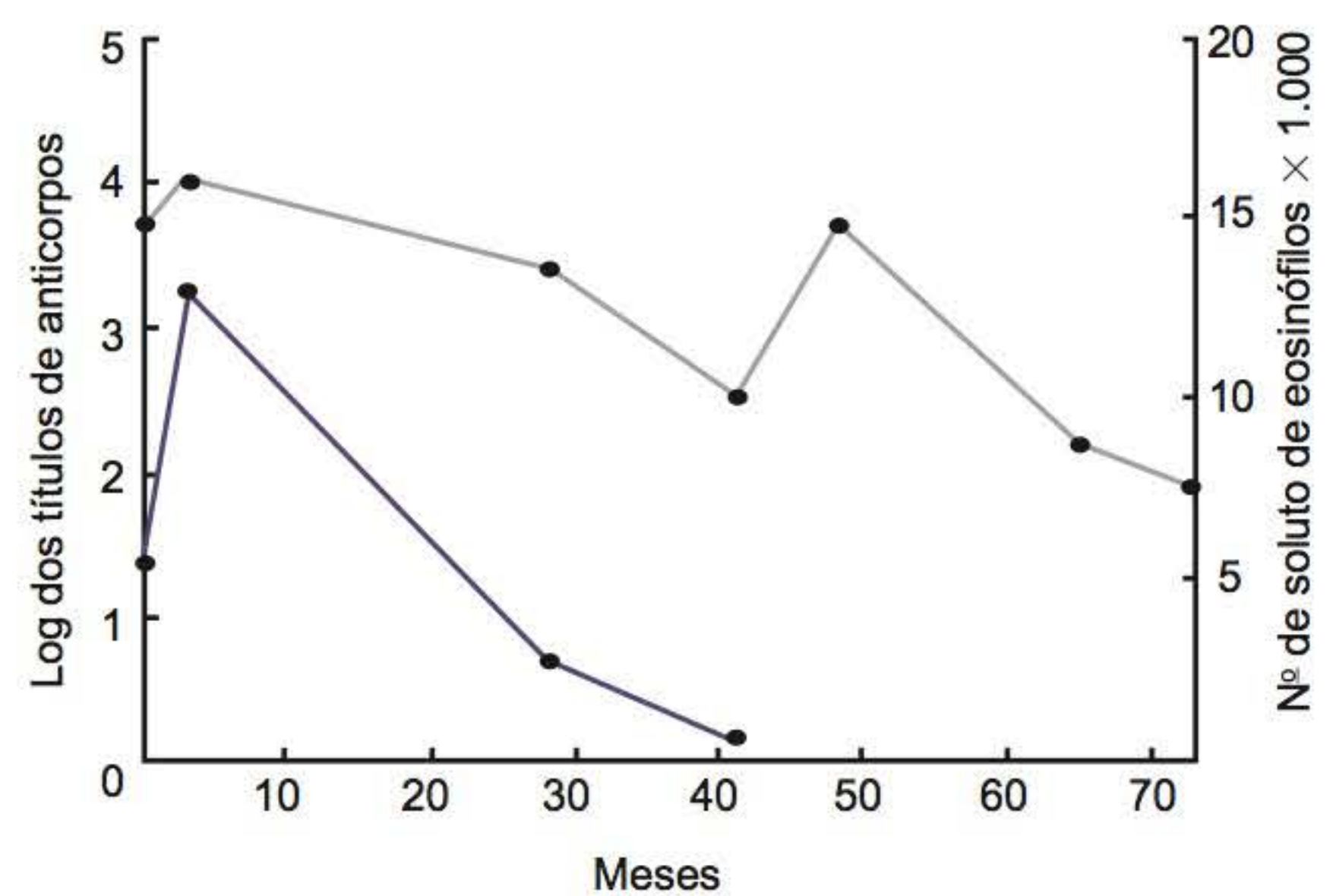


► **Sensibilidade.** A sensibilidade do teste para o diagnóstico sorológico da toxocaríase depende da resposta imune do hospedeiro paratênico. A toxocaríase visceral, causada por infecção com carga larvária muito grande, resulta na produção de anticorpos em níveis elevados. Nesses casos, a sensibilidade do teste ELISA com o antígeno TES é alta. As investigações para avaliar essa sensibilidade são predominantemente realizadas para anticorpos IgG.

Na toxocaríase, há uma dificuldade de se definir verdadeiros casos positivos. Na década de 1980, os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em Atlanta (EUA) haviam sugerido uma classificação, segundo alguns critérios: leucitose  $> 10.000/\text{mm}^3$ ; eosinofilia  $> 10\%$ ; título de anti-A  $\geq 1:200$ ; elevação dos níveis de IgG e IgM acima de 2 desvios padrão dos valores normais para idade e sexo e hepatomegalia. Assim, pacientes que se enquadravam em ao menos cinco desses seis critérios eram classificados como portadores de TV, enquanto aqueles com apenas 1 ou 2 eram tomados como controles negativos. No teste ELISA padronizado naquela época, tomando-se como limite de reatividade a diluição do soro de 1:32, obtiveram-se valores de sensibilidade e especificidade de 78 e 92%, respectivamente, e os valores preditivos, positivo e negativo, do teste foram de 86 e 88%. Posteriormente, verificou-se que aproximadamente 30% das amostras de soros de pacientes com presumível TV enviadas àquela instituição apresentaram-se positivas no ELISA. Adotando-se esse valor como referência aproximada da prevalência de TV entre os pacientes com sinais clínicos sugestivos da infecção, constatou-se que, para um limite de reatividade no ELISA de 1:32, os valores preditivos positivo e negativo foram de 79 e 91%, respectivamente. A avaliação da sensibilidade e especificidade adotada nesse estudo foi provavelmente subestimada, uma vez que alguns casos classificados como TV poderiam ser causados por outro helminto que apresentasse síndrome similar à de *Toxocara* e, também, porque pessoas incluídas como controles negativos, poderiam ter tido contato com o *Toxocara* spp. As limitações impostas pela falta de método de confirmação e/ou de exclusão da toxocaríase impedem uma avaliação satisfatória do teste utilizado para fins de imunodiagnóstico. Deve ser levado em conta, porém, que títulos positivos no ELISA entre os pacientes com pouco ou nenhum sinal clínico de TV ou TO podem indicar a prevalência de casos assintomáticos de toxocaríase.<sup>53</sup>

A sensibilidade do teste é função do título de reatividade, tomado como limite de positividade. Um modo prático e eficiente para definir o limiar de reatividade consiste em desenvolver o teste com painéis de soros de pessoas consideradas saudáveis (sem evidências de processo patogênico) e de pessoas com outras doenças parasitárias, com diagnóstico muito bem definido tanto do ponto de vista laboratorial como epidemiológico.

O título do anticorpo IgG anti-*Toxocara* spp., em casos humanos de TV, pode persistir por longo período, mesmo na ausência de sinais clínicos e laboratoriais, compatíveis com a infecção. Na Figura 31.1 apresentam-se os níveis de anticorpos obtidos em um paciente, durante 6 anos de acompanhamento (dados não publicados). Para ilustrar, de modo comparativo, foi incluída a curva do número absoluto de eosinófilos. Há poucos dados na literatura referentes ao aumento ou diminuição de títulos em soros de pacientes infectados pela larva de *T. canis*. A experiência científica indica que os títulos caem gradualmente e a resposta é individual, variando de um paciente para outro. É provável que o motivo para a queda esteja relacionado com o desaparecimento gradual da memória do sistema imune e seu aumento pela estimulação derivada da contínua ingestão de ovos larvados ou da reativação de larvas encistadas nos tecidos.<sup>54</sup>



**Figura 31.1** Nível de anticorpos IgG detectados por ELISA (linha cinza) e número absoluto de eosinófilos (linha azul) com relação ao tempo, em pacientes com infecção por *Toxocara canis*.

O imunodiagnóstico da toxocaríase ocular pode ser realizado pela pesquisa do anticorpo no soro ou no humor aquoso. Há relatos de encontro de anticorpos pelo teste ELISA nos fluidos oculares, porém com sorologia não reagente.<sup>78</sup>

Os níveis séricos são, em geral, inferiores aos encontrados na TV. Este fato pode estar relacionado com o menor número de larvas infectantes e/ou com o maior intervalo de tempo entre o início da infecção e a intervenção clínica e laboratorial.

Em estudo realizado nos CDC, com amostras de soro de 41 pacientes com diagnóstico clínico de invasão ocular por nematódeo e de 65 pacientes controles que não apresentavam invasão ocular por parasitos, observaram-se sensibilidade de 90% e especificidade de 91%, no ELISA, adotando-se como limiar de reatividade a diluição do soro correspondente a 1:8. Com base nesse estudo, admite-se que, para um paciente com lesão ocular compatível com invasão por nematódeo, título  $\geq 1:8$  no ELISA seja significativo para o diagnóstico da TO.<sup>53</sup>

A limitação imposta à prática médica para a obtenção de amostras de humor aquoso impede a real avaliação da sensibilidade e especificidade do teste ELISA com esse fluido biológico para fins de diagnóstico da toxocaríase.

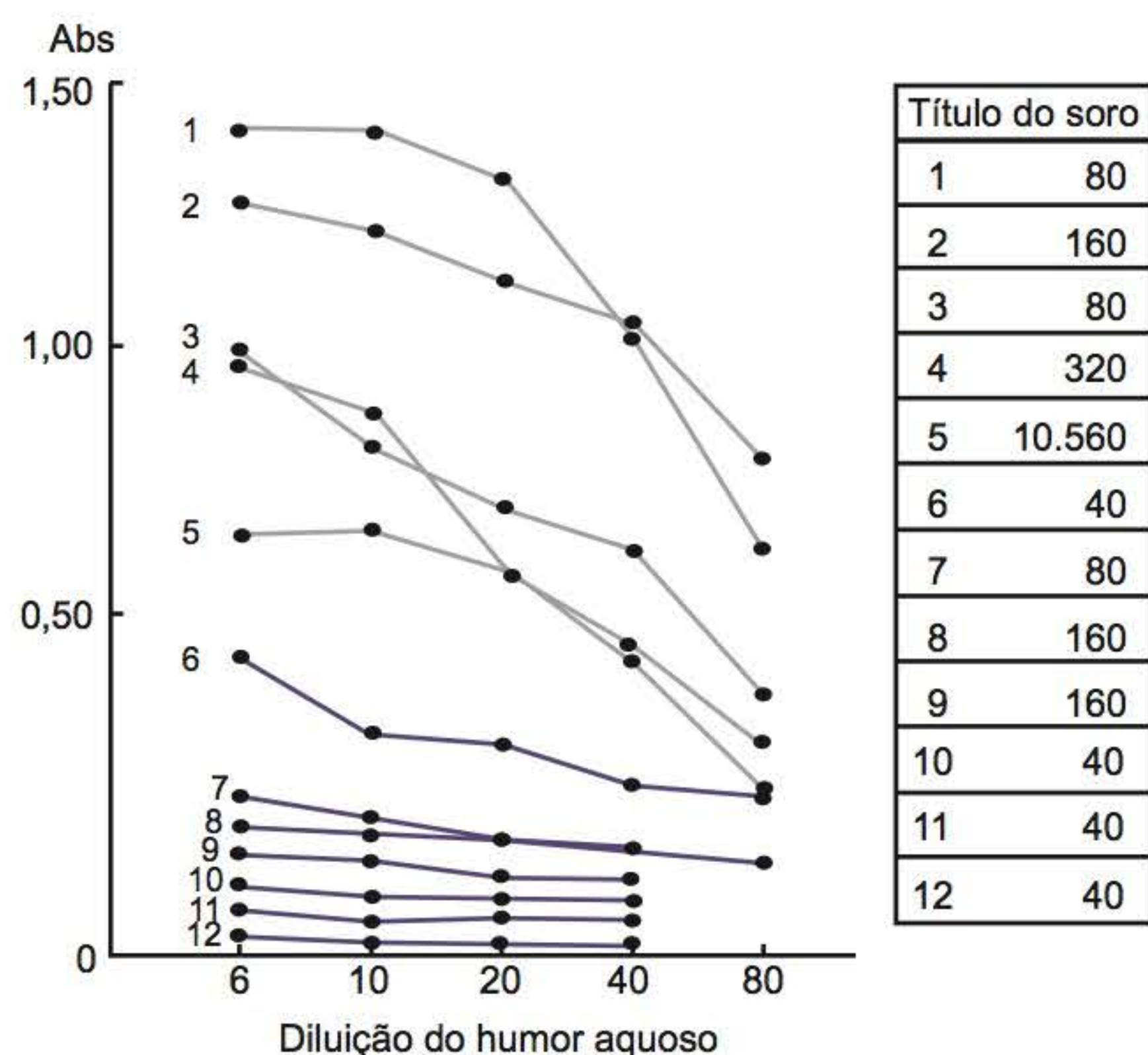
A Figura 31.2 ilustra as curvas dose-resposta obtidas no ELISA com antígeno TES, quando analisamos amostras de humor aquoso de cinco pacientes na faixa etária de 3 a 11 anos, com suspeita clínica de TO, e de 7 pacientes com diagnóstico de catarata, displasia retiniana ou retinoblastoma, sem suspeita de infecção pelo *T. canis*, tomados como referência (dados não publicados). Ao lado da figura estão expressos os valores dos títulos séricos para ambos os grupos.

Tomando-se a absorbância de 0,5 como limiar de reatividade, a diluição de 1:5 do humor aquoso permitiu, nesse estudo, diferenciar com boa precisão os pacientes com suspeita clínica de TO do grupo-controle.

Com relação ao anticorpo no humor aquoso, os dados da literatura são limitados para a definição da sensibilidade e da especificidade. Esse fato pode estar relacionado com a dificuldade de obtenção de amostras do humor aquoso na prática médica, pois não é um procedimento usual.

Outros testes têm sido desenvolvidos e propostos para caracterizar de maneira mais precisa a resposta imune de modo individual e sequencial durante o transcurso da infecção e detectar o antígeno, circulante ou localizado em tecidos, ao redor





**Figura 31.2** Anticorpos anti-*Toxocara canis* no humor aquoso, demonstrados por ELISA. As linhas cinzas representam suspeita de toxocaríase ocular; as linhas azuis representam outras afecções.

da larva encistada. Neste aspecto, mostram-se promissores os testes imunoenzimáticos, *immunoblotting* (IB) e de captura ou detecção do antígeno TES e os testes imuno-histoquímicos.

### Avidez de anticorpos IgG

Estudos sobre a avididade de anticorpos IgG têm sido realizados para diversas patologias, auxiliando na diferenciação das fases agudas e crônicas. Estudo com 1.376 amostras de soro de pacientes com toxocaríase, anticorpos de baixa avididade foram encontrados em 5,1% das amostras.<sup>79</sup> Em estudo de acompanhamento terapêutico da toxocaríase, todos os indivíduos apresentaram anticorpos de alta avididade, reforçando a ideia de que a maioria dos pacientes que procura assistência médica encontra-se no estágio crônico da infecção.<sup>5</sup> Estudo em murinos mostrou que anticorpos de alta avididade ligam-se a proteínas de 75 e 100 kDa, enquanto anticorpos de avididade variada se ligam a proteínas entre 37 e 25 kDa.<sup>80</sup>

### Subclasses de anticorpos IgG

Pesquisadores têm avaliado as diferentes subclasses com o objetivo de aprimorar a sensibilidade e a especificidade dos testes. Foi padronizado um teste ELISA para detecção de IgG4, que, embora apresente baixa sensibilidade, poderia ser utilizado juntamente com ELISA-IgG para melhorar a especificidade do teste.<sup>81</sup>

Outro estudo de subclasses de IgG, aplicando-se o teste ELISA, mostrou ser a IgG2 de melhor sensibilidade e a IgG3 de melhor especificidade.<sup>82</sup>

### Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais para o diagnóstico da toxocaríase têm sido utilizados por vários pesquisadores e representam um avanço no diagnóstico, permitindo a detecção da espécie de *Toxocara* envolvida, auxiliando na melhoria da especificidade e na quantificação de antígeno, bem como no acompanhamento terapêutico.<sup>60,61,77,83</sup> Um teste ELISA para captura de antígeno havia sido padronizado, porém por apresentar falsos resultados positivos, não foi indicado para uso rotineiro.<sup>84</sup>

### Dot-ELISA

Pesquisadores têm padronizado o dot-ELISA e comparado os resultados ao teste ELISA. As vantagens do teste seriam sua praticidade de execução e baixo custo.<sup>85,86</sup>

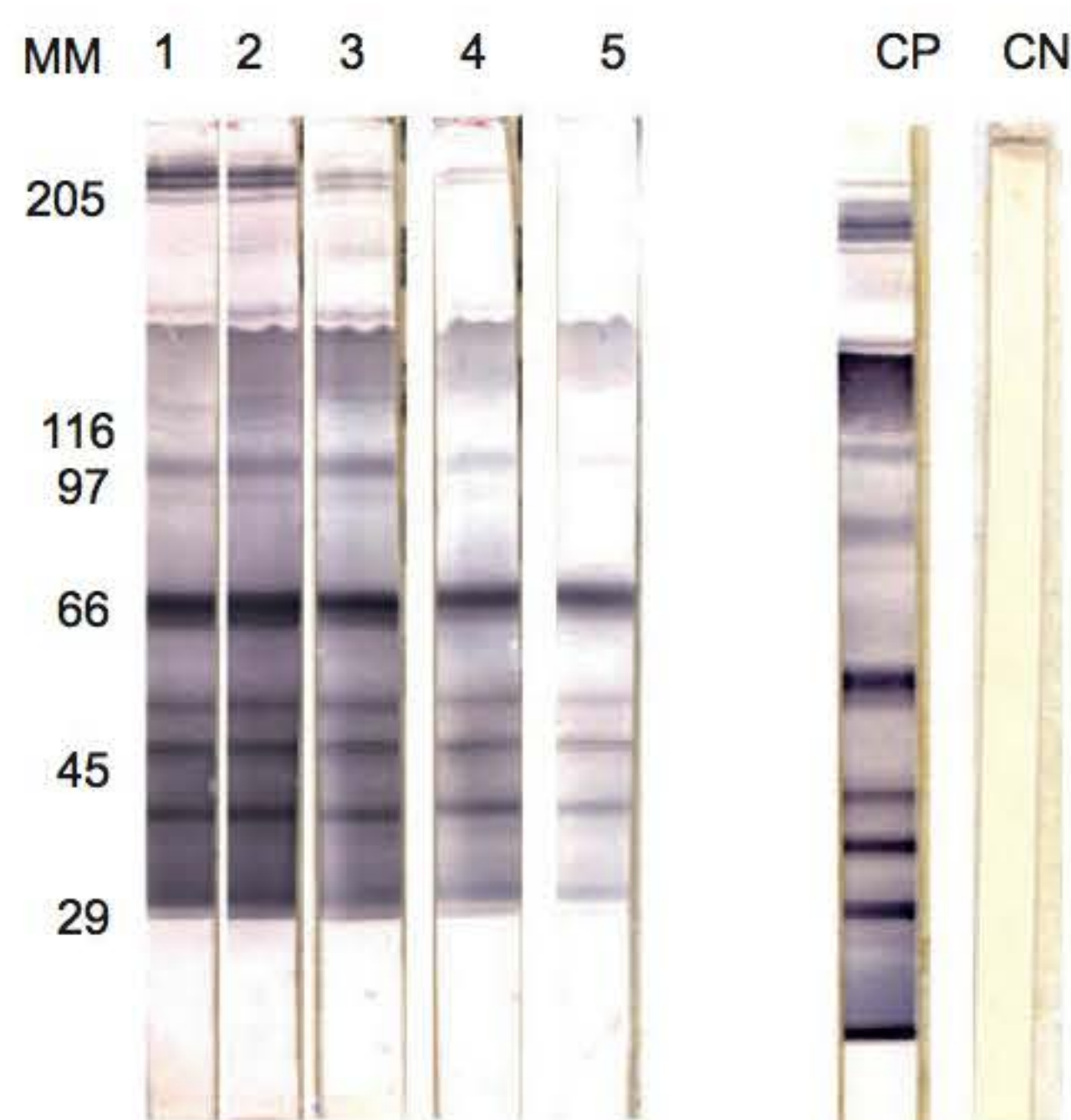
### Immunoblot

Estudo realizado na França mostrou que a técnica de *immunoblot* para pesquisa de anticorpos IgG, com antígeno TES, apresentou ótima correlação com o teste ELISA e pareceu ser mais específica. Sete bandas foram observadas e separadas em 2 grupos. O primeiro incluía 4 bandas de massas moleculares baixas, de 24 a 35 kDa; o segundo, 3 bandas de massas moleculares altas, de 132 a 200 kDa. As frações de baixa massa molecular mostraram-se mais específicas, por não apresentarem reatividade cruzada com soros de doenças causadas por outros helmintos.<sup>87</sup> A especificidade de bandas 24 a 35 kDa também foi observada por outros pesquisadores.<sup>88</sup> Alguns autores sugerem a utilização do teste IB como confirmatório para o diagnóstico da toxocaríase.<sup>89</sup>

No Brasil, em estudo de reação cruzada entre *T. canis* e *A. suum*, observou-se uma banda de massa molecular de aproximadamente 55 a 66 kDa como sendo a responsável pela reatividade cruzada e que desaparece após a absorção dos soros com antígeno de *A. suum*.<sup>90</sup>

A Figura 31.3 ilustra o perfil das bandas obtidas no teste IB, ao estudarmos, sequencialmente, amostras de soro de um paciente com toxocaríase visceral. A análise foi realizada com amostras coletadas durante o período de acompanhamento que se estendeu por 7 anos, e que estão representadas na figura pelos números de 1 a 5. Ao longo do acompanhamento terapêutico, em alguns pacientes ocorre um clareamento de anticorpos direcionados a certas frações antigênicas, e estes achados podem servir de base para futuras investigações de importantes epitopos relacionados com o diagnóstico e à terapêutica.<sup>91</sup>

O teste de *immunoblot* mostrou boa sensibilidade em estudo caso-controle de pacientes com toxocaríase, que apresentaram manifestações crônicas da pele, como urticária e prurigo/prurido.<sup>92</sup>



**Figura 31.3** *Immunoblot* IgG. Perfil sequencial de bandas em amostra de soro de um paciente no acompanhamento terapêutico. Padrão de anticorpos IgG: 1, antes do tratamento; 2, 20 meses após tratamento; 3, 42 meses após tratamento; 4, 70 meses após tratamento; 5, 89 meses após tratamento. MM = padrão de massa molecular (kDa); CP = controle positivo; CN = controle negativo.



### Pesquisa de antígeno circulante

A detecção de antígeno circulante de *T. canis* poderia auxiliar no diagnóstico, permitindo avaliar a carga parasitária, especialmente nas infecções recentes, assim como verificar a eficácia da terapêutica antiparasitária. Alguns testes têm sido descritos, como o ELISA “sanduíche”, incubando as amostras de soro em placa plástica recoberta com anticorpo monoclonal anti-*Toxocara*. O antígeno foi revelado por reação com outro anticorpo monoclonal marcado com isótopo radioativo ou com enzima. As amostras de soros foram previamente tratadas para a liberação de antígenos complexados aos anticorpos. Esse tratamento consiste em adicionar volume a volume de soro e solução de EDTA 0,2 M, pH 8,0, ferver por 5 min e centrifugar a 14.000 g, utilizando-se o sobrenadante no teste. Embora aplicado principalmente ao estudo de infecções experimentais, o teste apresentou boas perspectivas como adjuvante no diagnóstico da toxocaríase visceral e ocular.<sup>61</sup>

### Imuno-histoquímica

Técnicas imuno-histoquímicas têm sido empregadas para detecção do TES em tecidos. Em biopsia hepática de 5 pacientes que apresentavam evidências clínicas, dados laboratoriais e padrão histopatológico compatíveis com a infecção pela larva do *T. canis*, foi possível identificar o antígeno TES. Todos os pacientes apresentavam títulos séricos de anticorpos  $\geq 1:160$  no teste ELISA.<sup>93</sup>

O antígeno TES foi detectado dentro do citoplasma de macrófagos e nas células de Kupffer. Esse achado indica que um diagnóstico mais preciso pode ser alcançado quando os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos são complementados pela evidência de antígenos do parasito.

Foi realizado estudo da frequência de granulomas hepáticos induzidos por *Toxocara* em 310 necropsias de crianças pela técnica de imuno-histoquímica, encontrando-se 3,2% de positividade.<sup>94</sup>

### Imunoglobulina E

A imunoglobulina E tem sido objeto de estudo com o intuito de caracterizar sua importância no diagnóstico da infecção por *Toxocara*.

Há evidências de que, na TV e TO, anticorpos IgE específicos anti-*Toxocara* reagem preferencialmente com epitopos constituídos de carboidratos, enquanto na *covert toxocaria* a reação se dá principalmente com a fração polipeptídica. Esses fatos podem ser notados após o TES ser submetido à ação do metaperiodato de sódio 0,1 M e ao tratamento pelo calor, a 121°C, por 20 min, em autoclave, antes de ser utilizado no teste ELISA. O tratamento pelo calor altera a estrutura terciária de proteínas sem afetar os carboidratos, enquanto a oxidação pelo periodato degrada os carboidratos, reduzindo ou abolindo sua antigenicidade.<sup>55</sup>

Nos testes ELISA para detecção de IgE específica, constatou-se a necessidade de depleção das imunoglobulinas G por meio de técnicas, como coluna de proteína A-sefara ou tratamento com absorvente para fator reumatoide, uma vez que essas estão em maior abundância e bloqueiam a detecção da IgE.<sup>54,95</sup> O teste ELISA com antígeno TES foi desenvolvido para detectar IgE específica em soros de pacientes que apresentavam doenças alérgicas e outras helmintoses e de pacientes com sintomas clínicos indicativos de toxocaríase e reagentes para anticorpos IgG

no teste *immunoblotting* com o mesmo antígeno. O teste ELISA com antígeno TES apresentou índices de sensibilidade e especificidade considerados satisfatórios. O teste ELISA para IgE, se utilizado de modo isolado, não fornece resultado preciso para o imunodiagnóstico da toxocaríase, porém pode ser complementar ao método que detecta a IgG específica. A detecção de IgE específica mostrou-se importante na avaliação pós-terapêutica, uma vez que os níveis de anticorpos diminuem mais precocemente se comparados aos níveis de IgG.<sup>54,73</sup>

A resposta de isótipos nas diferentes formas clínicas da toxocaríase pode variar qualitativa e quantitativamente. Na toxocaríase ocular a detecção de IgE mostrou-se mais sensível que a detecção de IgG.<sup>96</sup>

### Reação em cadeia da polimerase

Técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* – PCR) têm auxiliado na identificação das diferentes espécies de nematoides e apresentam boas perspectivas para uso diagnóstico, investigações epidemiológicas e estudos de genética populacional.<sup>97,98</sup>

### Antígenos recombinantes

Estudos relacionados com o genoma do *T. canis* têm sido realizados, uma vez clonados vários genes que poderão ser utilizados como ferramentas para análise e prevenção da toxocaríase.<sup>99</sup> Estudos de genoma mitocondrial do *T. canis* também podem ter ampla aplicabilidade, contribuindo para o emprego de marcadores genéticos nas pesquisas de espécies crípticas, em estudos de especificidade, no potencial zoonótico, podendo auxiliar na prevenção e no controle da toxocaríase humana e em outros hospedeiros.<sup>100</sup>

Foi descrito um antígeno recombinante de larva de segundo estágio de *Toxocara canis*, de massa molecular de 41 kDa, que mostrou-se bastante específico. Segundo Coêlho *et al.*, por ser um antígeno não glicosilado, reduziria a reatividade cruzada com anticorpos que reconheceriam as frações de carboidratos presentes no antígeno TES.<sup>102</sup> Foi desenvolvido um teste ELISA, utilizando esse antígeno recombinante imobilizado em fase sólida constituída de pérolas de polisiloxano/polivinil álcool. Como vantagens sobre o teste convencional, houve maior diferença na densidade óptica entre os resultados positivos e negativos, bem como o baixo custo e facilidade na obtenção da fase sólida.<sup>102</sup>

Outro antígeno recombinante de *Toxocara canis*, de massa molecular de 120 kDa, expresso em bactéria e em levedura, foi considerado altamente específico e com possível aplicação nos ensaios sorod diagnósticos da toxocaríase.<sup>103,104</sup>

Foi descrito um teste ELISA-IgG, em modelo murino, altamente sensível, com base em antígeno recombinante arginina quinase para ser utilizado no sorod diagnóstico na toxocaríase visceral.<sup>105</sup>

Recentemente, foi desenvolvido um teste ELISA com antígeno recombinante de 30kDa para detecção de IgG4, apresentando altas sensibilidade e especificidade.<sup>106</sup>

A associação de antígenos recombinantes (TES-26, TES-30 e TES-120) no teste ELISA tem trazido bons resultados diagnósticos e parece ser promissora para uma detecção mais acurada da toxocaríase.<sup>107</sup>



### Preparo do antígeno TES

Ovos de *T. canis*, obtidos por dissecação do útero de verme adulto fêmea, são mantidos em solução de formalina a 2%, com aeração, no mínimo, por 28 dias, a 28°C, sob agitação diária. Esse processo permite o embrionamento dos ovos, que, após esse período, são lavados com solução salina tamponada com fosfatos (SSTF), por centrifugação a 2.000 rpm por 3 min. Em seguida, são ressuspensos em solução de hipoclorito de sódio a 5%, por aproximadamente 5 min, em temperatura ambiente, para remover as camadas proteica e quitinosa da membrana, processo este acompanhado ao microscópio óptico, e lavados com SSTF até a completa remoção da solução de hipoclorito. A seguir, são ressuspensos em meio de Eagle (meio mínimo essencial) contendo gentamicina (80 µg/mL) e transferidos assepticamente para um frasco Erlenmeyer contendo pérolas de vidro. A liberação das larvas é realizada sob agitação lenta, por um período de aproximadamente 10 min, acompanhando-se ao microscópio óptico. Ao final, transfere-se a suspensão para um funil de Baerman modificado, e as larvas são coletadas sob condições estéreis, em tubos de ensaio e mantidas em estufa a 37°C. Semanalmente, coleta-se o sobrenadante e acrescenta-se uma nova alíquota de meio de Eagle aos tubos contendo as larvas. Nessas condições, as larvas podem permanecer metabolicamente ativas por vários meses. Ao meio coletado, contendo produtos de excreção e secreção das larvas, adiciona-se inibidor de proteases PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM) e preserva-se em alíquotas a -20°C. Posteriormente, a mistura de diversas partidas de sobrenadante é concentrada de 50 a 100 vezes, em aparelho Amicon, membrana YM10, dialisada contra SSTF, centrifugada a 15.000 rpm, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante é filtrado em membrana Millipore de 0,22 µ, novamente acrescido de inibidor de protease PMSF, e preservado a -20°C até o momento do uso.<sup>54,57</sup>

## ► Perspectivas

A toxocaríase é considerada uma doença negligenciada e há muitos desafios a serem superados. São necessárias melhor padronização dos testes nos diferentes laboratórios e definição de antígenos mais específicos para auxiliar no diagnóstico, terapêutica, bem como nos inquéritos soropidemiológicos.<sup>89,108</sup> Até o momento, o resultado positivo no ELISA, de modo individual para um paciente, não permite ao clínico distinguir entre as apresentações aguda, crônica e atípica. Diante disso, torna-se importante o aprofundamento dos estudos no sentido de desenvolver métodos precisos para caracterizar a resposta imune, diferentes classes de anticorpos, bem como subclasses de anticorpos, de modo individual e sequencial, durante o curso da infecção. Na forma ocular, são poucos os dados sobre prevalência da toxocaríase, e não se sabe quais seriam os níveis de anticorpos protetores ou mesmo se os anticorpos seriam suficientes para a proteção das diferentes apresentações oculares.<sup>109</sup>

Ferramentas para o diagnóstico biológico, principalmente técnicas sorológicas, devem ser aprimoradas e os estudos ficarão concentrados na avaliação da terapêutica.<sup>110</sup> A utilização de peptídeos recombinantes obtidos por clonagem e expressão de genes permitirá a pesquisa de anticorpos de maior especificidade.<sup>101,107</sup>

## ► Referências bibliográficas

1. Beaver PC, Snyder H, Carrera G *et al.* Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. *Pediatrics* 1952; 9: 7-19.
2. Beaver PC. The nature of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1969; 55:3-12.

3. Soulsby EJJ. Nematodes of small intestine. In: *Methods in zone eletrofore-sis*. 2<sup>nd</sup> ed. London, 1965.
4. Bissereu B, Woodruff AW, Hutchinson RI. Infection with adult *Toxocara canis*. *Br Med J* 1966; 1:1583-1584.
5. Beaver PC. Zoonosis with particular reference to parasites of veterinary importance. In: *Biology of Parasites*. New York: Academic Press, 1966.
6. Glickman LT, Chaudry IU, Constantino J *et al.* Pica patterns, toxocariasis and elevated blood lead in children. *Amer J Trop Med Hyg* 1981; 30: 77-80.
7. Holland C, O'Connor P, Taylor MRH *et al.* Families, parks, gardens and toxocariasis. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 225-231.
8. Chieffi PP, Muller EE. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Rev Saúde Pub (S. Paulo)* 1976; 10: 367-372.
9. Ferreira LF, Oliveira E, Camillo-Coura L. Sobre a presença de ovos de *Toxocara* em praças da cidade do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 1976; 10: 1-4.
10. Nagakura K, Takehara H, Kaneda Y *et al.* Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J Infect Dis* 1989; 160: 735-6.
11. Salem G, Schantz P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clin Infect Dis (Letter)* 1992; 15:743-744.
12. Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidem Rev* 1981; 3: 230-250.
13. Ajayi O, Duhlinka D, Agwale S *et al.* Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 9:147-149.
14. Cancrini G, Bartoloni A, Zaffaroni E *et al.* Seroprevalence of *Toxocara canis* IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parasitologia* 1999; 40: 473-475.
15. Luo ZJ, Wang GX, Yang CI *et al.* Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. *J Parasitol* 1999; 85:252-256.
16. Kincekova J, Reiterova K, Dubinky P. Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J Helminthol* 1999; 73:323-328.
17. Lynch NR, Eddy K, Hodgen NA *et al.* Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in tropical Venezuela. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 275-281.
18. Matsumura K, Kazuta Y, Endo R *et al.* The IgA antibody activities in relation to the parasitologic status of *Toxocara canis* in dogs. *Zbl Bakt Mikrob Hyg A* 1983; 256: 239-243.
19. Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH *et al.* Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2010; 104: 3-23.
20. Chieffi PP, Ueda M, Camargo ED *et al.* Visceral larva migrans: a seroepidemiological survey in five municipalities of São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1990; 32: 204-210.
21. Alderete JM, Jacob CM, Pastorino AC *et al.* Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 593-597.
22. Elefant GR, Silva-Nunes M, Malafronte R.S *et al.* Human toxocariasis in rural Brazilian Amazonia: seroprevalence, risk factors, and spatial distribution. *Amer J Trop Med Hyg* 2008; 79: 93-98.
23. Prestes-Carneiro LE, Santarem V, Zago SC *et al.* Seroepidemiology of toxocariasis in a rural settlement in São Paulo State, Brazil. *Ann Trop Med Parasit* 2009; 102: 347-356.
24. Santos GM, Almeida e Silva S, Passos Barbosa A *et al.* Investigação soropidemiológica sobre Larva Migrans Visceral por *Toxocara canis* em usuários de Serviços de Saúde de Goiânia, GO. *Rev Pat Trop* 2009; 38: 197-206.
25. Chieffi PP, Santos SV, Queiroz ML *et al.* Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. *Rev Inst Méd Trop S Paulo* 2009; 51(6): 301-308.
26. Glickman LT, Schantz PM, Cypess RH. Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1979; 73: 254-258.
27. Jacob CMA, Peres BA, Oselka GW *et al.* Síndrome da larva migrans visceral por *Toxocara canis*. *Pediatrics (S. Paulo)* 1987; 9: 9-12.
28. Jacob CMA, Pastorino AC, Peres BA *et al.* Clinical and laboratorial features of visceral toxocariasis in infancy. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1994; 36: 19-26.
29. Jacob CMA. Análise evolutiva dos parâmetros clínico-laboratoriais da Toxocaríase Visceral na infância. São Paulo, 1995. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.)
30. Gavinet B, Piarroux R, Aubin F *et al.* Cutaneous manifestations of human toxocariasis. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59:1031-1042.
31. Humbert P, Niezborala M, Salembier R *et al.* Skin manifestations associated to toxocariasis: a case control study. *Dermatology* 2000; 201:230-234.



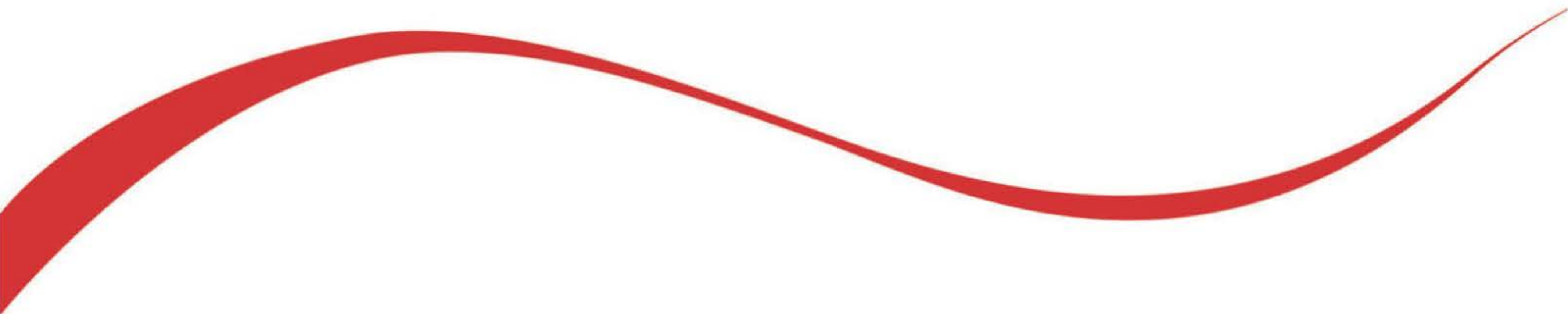
32. Wolfrom E, Chene G, Lejoly-Boisseau H *et al.* Chronic urticari and *Toxocara canis* infection: a case-control study. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130(suppl): S43-52.
33. Ismail MAM, Khalafallah O. *Toxocara canis* and chronic urticaria in Egyptian patients. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 833-840.
34. Huntley CC, Costas MC, Williams RC *et al.* Visceral Larva Migrans Syndrome: clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. *Pediatrics* 1965; 36:523-536.
35. Beshear JR, Hendley JO. Severe pulmonary involvement in Visceral Larva migrans. *Am J Dis Child* 1973; 125: 599-600.
36. Desowitz RS, Burright RG, Donovan PJ *et al.* Antibodies to canine helminth parasites in asmathic and nonasmathic children. *Intern Arch Allergy Appl Immunol* 1981; 65: 361-366.
37. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Op Allergy Clin Immunol* 2009; 9:29-37.
38. Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49(5):279-287.
39. Salvador S, Ribeiro R, Winckler MI *et al.* Pediatric neurotoxocarosis with concomitant cerebral, cerebellar, and peripheral nervous system involvement: case report and review of the literature. *J Pediatr (RJ)* 2010; 86(6):531-534.
40. Wilder HC. Nematode endophthalmitis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1950; 55: 99-109.
41. Schantz PM, Meyer D, Glickman LT. Clinical, serologic and epidemiologic characteristics of ocular toxocarosis. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 24-28.
42. Petithory JC, Chaumeil C, Liotet S *et al.* Immunological studies on ocular larva migrans. In: Lewis JW, Maizels RM. *Toxocara and toxocarosis. Clinical, epidemiological and molecular perspectives.* London: British Society for Parasitology, 1993. p. 81-89.
43. Snyder CH. Visceral Larva Migrans – Ten years' experience. *Pediatrics* 1961; 28: 85-91.
44. Bass JL, Mehta KA, Glickman LT *et al.* Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. *N Engl J Med* 1983; 308:723-724.
45. Magnaval JF. Éléments nouveaux dans la séméiologie des "larva migrans viscérales". *Presse Med* 1987; 16:151-154.
46. Huntley CC, Lyerly AD, Patterson MV. Isohemagglutinins in parasitic infection. *JAMA* 1969; 208:1145-1148.
47. Ehrhard T, Kernbaum S. *Toxocara canis* et toxocarose humaine. *Bull Inst Pasteur* 1979; 77: 225-288.
48. Abdel-Hameed AA. Effects of benzimidazole antihelmintics on the survival and migratory behaviour of *Toxocara canis* larvae in the mouse. *Am J Vet Res* 1984; 45: 1430-1433.
49. Abo-Shebada MN, Herbert IV. Antihelmintic effect of levamisole, ivermectin, albendazole and fenbendazole on larval *Toxocara canis* infection in mice. *Res Vet Sci* 1984; 36: 87-91.
50. Barrera MG, Leonardi D, Bolmaro RE *et al.* In vivo evaluation of albendazol microspheres for the treatment of *Toxocara canis* larva migrans. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 75(3): 451-454.
51. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P *et al.* Highlights of human toxocarosis. *Korean J Parasitol* 2001a; 39:1-11.
52. De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocarosis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979; 32: 284-288.
53. Glickman LT, Schantz PM, Grieve RB. Toxocarosis. In: Walls KW, Schantz PM. *Immunodiagnosis of parasitic diseases. Vol. 1, Helminthic diseases* (London), Academic Press 1986; p. 201-231.
54. Rubinsky-Elefant G, Shimizu SH, Sanchez MCA *et al.* A serological follow-up of toxocarosis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Lab Anal* 2006; 20: 164-172.
55. Smith HV. Antibody reactivity in human toxocarosis. In: Lewis JW, Maizels RM. *Toxocara and toxocarosis. Clinical, epidemiological and molecular perspectives.* London: British Society for Parasitology 1993; p. 141-150.
56. Magnaval JF, Berry A, Fabre R *et al.* Eosinophil cationic protein as a marker of active human *Toxocara* infection. *Allergy* 2001b; 56: 1096-1099.
57. De Savigny DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasit* 1975; 61: 781-782.
58. Badley JE, Grieve RB, Bowman D *et al.* Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *J Parasit* 1987; 73: 593-600.
59. Maizels RM, Gems DH, Page AP. Synthesis and secretion of TES antigens from *Toxocara canis* infective larvae. In: Lewis JW, Maizels RM. *Toxocara and toxocarosis. Clinical, epidemiological and molecular perspectives.* London: British Society for Parasitology 1993; p. 141-150.
60. Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M *et al.* Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J Immunol* 1987; 139: 207-214.
61. Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH *et al.* Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol* 1988; 74: 236-241.
62. Sugane K, Oshima T. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology* 1983a; 50: 113-120.
63. Sugane K, Oshima T. Activation of complement in C-reactive protein positive sera by phosphorylcholine bearing component isolated from parasite extract. *Paras Immunol* 1983b; 5: 385-395.
64. Robertson BD, Bianco AE, McKerrow JH *et al.* Proteolytic enzymes secreted by larvae of the nematode *Toxocara canis*. *Exp Parasit* 1989; 69: 30-36.
65. Del Prete GF, De Carli CM, Mastromauro C *et al.* Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991; 88: 346-350.
66. Kayes SG. Human toxocarosis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. *Chem Immunol* 1997; 66: 99-124.
67. Takamoto M, Wang Z, Watanabe N *et al.* Eosinophilia, IgE production, and cytokine production by lung T cells in surface CD4-deficient mutant mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology* 1998; 95: 97-104.
68. Takamoto M, Ovington KS, Behm CA *et al.* Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57B1/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology* 1997; 90: 511-517.
69. Faccioli LH, Mokwa VF, Silva CL *et al.* IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. *Mediators of Inflammation* 1996; 5: 24-31.
70. Owhashi M, Arita H, Niwa A. Production of eosinophil chemotactic factor by CD8(+) T-cells in *Toxocara canis*-infected mice. *Parasitol Res* 1998; 84: 136-138.
71. Loukas A, Selzer PM, Maizels RM. Characterisation of Tc-cpl-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 92: 275-289.
72. Schantz P. *Toxocara* larva migrans now. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 21-34.
73. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P *et al.* Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and post-treatment follow-up of human toxocarosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2269-2274.
74. Ishida MMI, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW *et al.* Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Tropica* 2003; 89: 73-84.
75. Song KH, Hayasaki M, Cho KW *et al.* Cross-reactivity between sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and crude extract of *Toxocara canis*. *Kor J Parasitol* 2002; 40: 195-198.
76. Glickman LT, Schantz PM. Do *Toxocara canis* larval antigens used in enzyme-linked immunosorbent assay for visceral larva migrans cross-react with AB isohemagglutinins and give false positive results? *Z Parasitenk* 1985; 71: 395-400.
77. Iddawela RD, Rajapakse RP, Perera NA *et al.* Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Kor J Parasitol* 2007; 45: 19-26.
78. Alabiad CR, Albin TA, Santos CI *et al.* Ocular toxocarosis in a seronegative adult. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2010; 2: 1-3.
79. Hubner J, Uhlikova M, Leissova M. Diagnosis of the early phase of larval toxocarosis using IgG avidity. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2001; 50: 67-70.
80. Fenoy S, Rodero M, Pons E *et al.* Follow-up of antibody avidity in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol* 2008; 135: 725-733.
81. Noordin R, Smith HV, Mohamad S *et al.* Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Tropica* 2005; 93: 57-62.
82. Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G *et al.* Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocarosis. *Acta Tropica* 2008; 106: 90-95.
83. Yokoi K, Kobayashi F, Sakai J *et al.* Sandwich ELISA detection of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae using a specific monoclonal antibody. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33: 33-37.
84. Gillespie SH, Bidwell D, Voller A *et al.* Diagnosis of human toxocarosis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Pathol* 1993; 46: 551-554.
85. Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ *et al.* Standardization of DOT-ELISA for the serological diagnosis of Toxocarosis and comparison of the assay with ELISA. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1992; 34: 55-60.
86. Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocarosis. *Mem Inst Osw Cruz* 2006; 101: 71-74.



87. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P *et al.* Application of the *Western blotting* procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasit Res* 1991; 77: 697-702.
88. Roldán WH, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Osw Cruz* 2009; 194: 411-418.
89. Smith H, Holland C, Taylor M *et al.* How common is human Toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitol* 2009; 25: 182-188.
90. Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF *et al.* Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western-blotting technique. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39: 253-256.
91. Rubinsky-Elefant G, Hoshino-Shimizu S, Jacob CMA *et al.* Potential immunological markers for diagnosis and therapeutic assessment of toxocariasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2011; 53 (2): 61-65.
92. Bellanger AP, Humbert P, Gavignet B *et al.* Comparative assessment of enzyme-linked immunosorbent assay and *Western blot* for the diagnosis of toxocariasis in patients with skin disorders. *Br J Dermatol* 2010; 162: 80-82.
93. De Brito T, Chieffi PP, Peres BA *et al.* Immunohistochemical detection of toxocaral antigens in human liver biopsies. *Int J Surg Path* 1994; 2: 117-124.
94. Musso C, Castelo JS, Tsanaclis AM *et al.* Prevalence of *Toxocara*-induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitoria, ES, Brazil. *Virchows Arch* 2007; 450: 411-447.
95. Uhlikova M, Hubner J, Kolarova L *et al.* Immunological studies on human larval toxocarosis. *Cent Eur J Public Health* 1996; 4: 242-245.
96. Smith HV, Kennedy MW. Significance and quantification of antigen-specific IgE in helminthic infections of humans. *J Clin Immunoassay* 1993; 16: 131-143.
97. Jacobs DE, Zhu X, Gasser RB *et al.* PCR-based methods for identification of potential zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica* 1997; 68: 191-200.
98. Zhu XQ, Gasser RB, Chilton NB *et al.* Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. *J Helminthol* 2001; 75: 101-108.
99. Maizels RM, Tetteh KKA, Loukas A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int J Parasitol* 2000; 30: 495-508.
100. Jex AR, Waeschenbach A, Littlewood DT *et al.* The mitochondrial genome of *Toxocara canis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e273.
101. Yamasaki H, Araki K, Lim PKC *et al.* Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of Human Toxocariasis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1409-1413.
102. Coêlho RAL, Yamasaki H, Perez E *et al.* The use of Polysiloxane/polyvinyl alcohol beads a solid phase in IgG anti-*Toxocara canis* detection using a recombinant antigen. *Mem Inst Osw Cruz* 2003; 98:391-393.
103. Fong MY, Lau YL, Jamaiah I *et al.* Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigen TES-120 in *Escherichia coli*. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 2003; 34: 723-726.
104. Fong MY, Lau YL. Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Parasitol Res* 2004; 92: 173-176.
105. Wickramasinghe S, Yatawara L, Nagataki M *et al.* Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitol Res* 2008; 103: 853-858.
106. Norhaida A, Suharni M, Liza Sharmini AT *et al.* rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102: 151-160.
107. Mohamad S, Che Azmi N, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for human toxocariasis using three recombinant antigens (TES-26, TES-30, and TES-120). *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1712-1717.
108. Hotez PT, Wilkins PP. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? *PLoS Negl Trop* 2009; 3 (3): e400.
109. Taylor MRH. The epidemiology of ocular toxocariasis. *J Helminthol* 2001; 75: 109-118.
110. Pelloux H, Faure O. Toxocariasis in adults. *Rev Med Interne* 2004; 25: 201-206.



## Seção 6 | Fungos





■ Capítulo 32 | Infecções Fúngicas, 365



## Capítulo 32

---

# Infecções Fúngicas

*Maria José S. Mendes-Giannini,  
Márcia de Souza Carvalho Melhem e  
Ana Marisa Fusco Almeida*

- Introdução, 366
- Qualidade em laboratório de micologia, 367
- Exames micológicos, 368
- Identificação de culturas de fungos, 376
- Metodologias auxiliares de diagnóstico micológico, 385
- Micoses superficiais, 393
- Micoses cutâneas, 397
- Micoses cutâneas e sistêmicas, 403
- Fungos dimórficos causadores de micoses sistêmicas, 416
- Fungos demácios, 431
- Outras micoses, 438
- Bibliografia, 440



## ► Introdução

Há mais de 1 milhão de espécies de fungos, mas apenas cerca de 400 causam doenças relevantes para o homem, animais ou plantas. Dentre eles, aproximadamente 100 são capazes de causar infecções no homem, conhecidas como micoses. Os fungos podem causar variados processos infecciosos, desde manifestações brandas até quadros clínicos graves e, por vezes, fatais. As infecções fúngicas parecem ser acidentais em sua natureza e a maioria é adquirida por exposição à fonte natural do fungo, sendo poucas as transmitidas por contato direto homem a homem.

Nas últimas décadas, as doenças fúngicas passaram a ser um importante problema de saúde pública, devido ao uso intenso de medicamentos antibacterianos e imunossupressores. Indivíduos com flora bacteriana alterada ou com mecanismos de defesa comprometidos, como pessoas com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), são mais propensos a desenvolver infecções por fungos ditos oportunistas. O laboratório que dispõe de métodos para identificação dos patógenos tradicionais, por exemplo *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, deve se capacitar para o desafio de isolar e classificar os chamados agentes oportunistas. O isolamento desses agentes a partir de espécimes clínicos, normalmente, estéreis, requer interpretação criteriosa e seu potencial patogênico não deve ser desprezado.

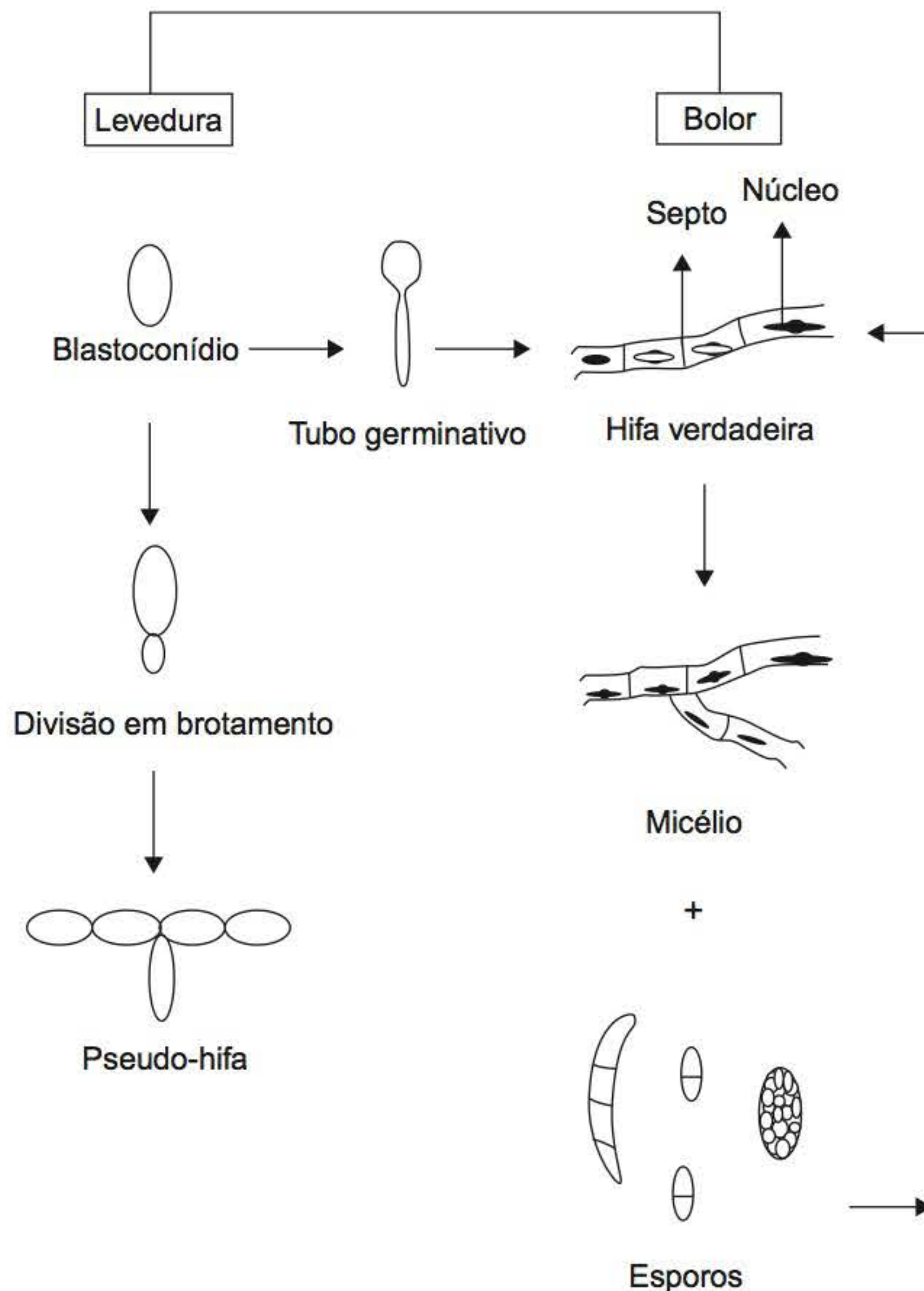
A correta identificação dos fungos é de grande importância, tanto na prática clínica quanto em fitopatologia, biodegradação, biotecnologia e estudos ambientais. A classificação dos fungos tem sido fundamentada principalmente em características morfológicas. Além dessas, também outros testes, como os fisiológicos e bioquímicos e os moleculares, têm sido utilizados na classificação e também na identificação de fungos. Para o diagnóstico de micoses, causadas por fungos patogênicos, métodos mais rápidos e específicos estão em desenvolvimento e são necessários. Os métodos moleculares estão se tornando cada vez mais importantes como parte do diagnóstico no laboratório de micologia clínica.

Fungos constituem um grupo de organismos eucariotos sem mobilidade própria, heterotróficos, essencialmente aeróbios, com limitada capacidade anaeróbia e que podem sintetizar lisina pela via biossintética do ácido L- $\alpha$ -aminoadípico. Acumulam glicogênio como material de reserva, são desprovidos de clorofila e apresentam núcleo rodeado por membrana nuclear, com cromossomos que contêm DNA com regiões codantes (éxons) e não codantes (íntrons), a membrana plasmática contém ergosterol e o aparelho de Golgi nem sempre está presente. Reproduzem-se por esporos, têm parede celular rígida, quitinosa, retículo endoplasmático, mitocôndrias semelhantes às de células de plantas e animais, além de vacúolos, microtúbulos e ribossomos do tipo 80S. Os fungos são seres ubiqüitários e importantes na decomposição da matéria orgânica. Podem ser unicelulares ou multicelulares e divididos basicamente em filamentosos (bolor, mofo) e leveduras, conforme sua morfologia. Exemplos de filamentosos são *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. As leveduras de interesse médico pertencem, em sua grande maioria, aos gêneros *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Trichosporon* sp. e *Pichia* sp. Em muitos textos de micologia são descritos actinomicetos, algas dos gêneros *Prototheca* e *Chlorella* e *Rhinosporidium seeberi*, agente da rinopsporidiose. Actinomicetos são bactérias aeróbias e anaeróbias, filamentosas procariotas, agentes de actinomicetomas, e as algas podem

ser isoladas facilmente nos meios tradicionais usados em micologia. O *Rhinosporidium seeberi* foi considerado fungo no passado, mas estudos moleculares mostraram sua correlação com protista aquático do reino Protozoa.

O sistema vegetativo dos fungos filamentosos é constituído de hifas ou micélio, que contêm septos, regulares ou não. As hifas são oriundas, em geral, de esporos que germinam sob condições adequadas de temperatura e umidade. As hifas podem ser vegetativas, para absorver nutrientes, ou especializadas, a fim de originar o sistema reprodutor para a formação de esporos (Figura 32.1). A observação microscópica do sistema reprodutivo é fundamental para a classificação dos fungos filamentosos, permitindo a identificação do gênero, e, muitas vezes, da espécie. Atualmente, métodos moleculares podem ser empregados em estudos filogenéticos, taxonômicos, no diagnóstico e em estudos epidemiológicos. A identificação de fungos com esses métodos é uma alternativa aos métodos fenotípicos, e, principalmente no caso de fungos filamentosos, encontra grande aplicabilidade.

As leveduras não apresentam grande variação na estrutura micromorfológica, e necessitam, portanto, de provas fisiológicas e bioquímicas para a determinação de gênero e espécie. A estrutura básica das leveduras é, em geral, unicelular com reprodução por gemulação ou brotamento, por blastoconídios. Algumas delas têm capacidade para a produção de hifas. Essas hifas podem surgir diretamente, de um blastoconídio, a partir da formação de um tubo germinativo e, neste caso, são denominadas hifas verdadeiras; outras, ditas pseudo-hifas, surgem da junção de vários blastoconídios, que se mantêm unidos



**Figura 32.1** Representação esquemática de estruturas fúngicas básicas.



após sua formação. Alguns gêneros apresentam como característica principal uma cápsula de natureza polissacarídica. Essa formação é particularmente útil na identificação do gênero *Cryptococcus*, de grande interesse em micologia médica.

Dentre os fungos filamentosos há um pequeno grupo, mas importante, constituído por fungos dimórficos, assim chamados por apresentarem formas leveduriformes à temperatura de 35 a 37°C. No Brasil, os gêneros mais importantes são *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e, mais recentemente, *Coccidioides immitis*. É fundamental o entendimento desse fenômeno para o diagnóstico laboratorial de paracoccidioidomicose, histoplas-mose, esporotricose e coccidioidomicose. O dimorfismo é regulado por fatores como temperatura, concentração de CO<sub>2</sub>, pH e níveis de cisteína ou outros compostos que contêm grupos sulfidrílicos.

A morfologia de um fungo pode variar de forma conside-rável, de modo que um determinado fungo apresenta uma forma no tecido hospedeiro diferente da encontrada *in vitro*, em meios de cultura. O conhecimento das diversas formas que um fungo pode adquirir, conforme o substrato que o mantém, é um fator decisivo para sua correta identificação.

Os fungos são atualmente colocados em reino próprio, o reino Fungi (Quadro 32.1).

► **Qualidade em laboratório de micologia**

No mundo atual, a palavra de ordem é qualidade e todos os laboratórios devem participar de programas específicos que visem à melhoria dos serviços prestados. O maior objetivo dos programas é a conquista de credenciamento junto a insti-tuições de referência, como o Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia). Para o credenciamento, o laboratório pode esco-lher um dos sistemas (p. ex., ISO, BPL-C) ou normas ditadas pela ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (p. ex., Isoguia 25). Mas, independentemente do credenciamento, os laboratórios devem participar, ao menos de maneira básica, de programas de qualidade organizados por sociedades e asso-ciações de classe.

A busca de assessoria especializada para a implantação do sistema de qualidade depende do programa escolhido. Mas o

**Quadro 32.1 - Esquema simplificado dos principais grupos taxonômicos do reino Fungi de importância em micologia médica.**

Grupos taxonômicos	Gêneros representativos	Doenças
<i>Divisão: Zygomycota</i> Classe: Zygomycetes Ordem: Mucorales Ordem: Entomophthorales	<i>Rhizopus, Mucor, Rhizomucor, Absidia, Syncephalastrum</i> <i>Basidiobolus, Conidiobolus</i>	Mucormicose  Entomofotoromicose
<i>Divisão: Ascomycota</i> Classe: Ascomycetes Ordem: Saccharomycetales Ordem: Onygenales  Ordem: Eurotiales Ordem: Microascales  Ordem: Pyrenomycetes Classe: Archiascomycetes Ordem: Pneumocystidales	<i>Saccharomyces, Pichia</i> (forma teleomorfa de <i>Candida</i> sp.) <i>Arthoderma</i> (forma teleomorfa de <i>Microsporum</i> e <i>Trichophyton</i> sp.); <i>Ajellomyces</i> (forma teleomorfa de <i>Histoplasma</i> e <i>Blastomyces</i> sp.)  Forma teleomorfa de alguns <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> sp. <i>Pseudallescheria boydii</i> (forma teleomorfa de <i>Scedosporium apiospermum</i> ) <i>Nectria, Gibberella</i> (formas teleomorfas de <i>Fusarium</i> spp.)  <i>Pneumocystis jirovecii carinii</i>	Leveduroses  Dermatofitose Micoses sistêmicas Aspergilose, hialo-hifomicose Micetoma, hialo-hifomicose  Queratite micótica: hialo-hifomicose  Pneumonia
<i>Divisão: Basidiomycota</i> Classe: Basidiomycetes Ordem: Agaricales Ordem: Aphyllophorales Ordem: Filobasidiales	<i>Amanita, Agaricus</i> (fungos superiores) <i>Schizophyllum comune</i> <i>Filobasidiella</i> (forma teleomorfa de <i>Cryptococcus neoformans</i> )	Envenenamento por ingestão de espécies venenosas Micoses variadas Criptococose
<i>Divisão: Deuteromycota</i> Classe: Deuteromycetes Ordem: Cryptococcales Ordem: Moniliales Família: Moniliaceae Família: Dematiaceae  Ordem: Sphaeropsidales	<i>Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Malassezia</i> <i>Epidermophyton, Coccidioides</i> <i>Paracoccidioides, Sporothrix, Aspergillus</i> <i>Phialophora, Fonsecaea, Cladophialophora Exophiala, Wangiella, Xylohypha, Alternaria</i> (fungos demácios) <i>Phoma</i>	Leveduroses Micoses variadas Cromoblastomicose, micetoma e feo-hifomicose  Feo-hifomicose
<i>Divisão: Oomycota</i> Classe: Oomycetes	<i>Pythium</i>	Fitiose

Adaptado com modificações de Dixon et al., 1999.



sucesso da implantação de qualquer sistema depende, acima de tudo, dos recursos humanos do laboratório. O grau de compromisso assumido com a proposta de qualidade vai definir a eficácia e eficiência desse processo. A motivação e capacitação do elemento humano são fatores fundamentais em todas as etapas de implantação.

A organização do trabalho por procedimentos operacionais padrão (POP) em que são descritas as etapas que devem ser realizadas em cada atividade, ou ainda como se deve operar, manter e calibrar os equipamentos são requisitos mínimos de todos os sistemas de qualidade e dependem, fundamentalmente, dos funcionários. Em regra, é necessário o envolvimento de empresas especializadas em calibração de equipamentos e vidrarias, seja para capacitar funcionários do laboratório ou para prestar, diretamente, esses serviços dentro do programa de qualidade.

A adoção de POP pressupõe que todas as atividades seguem um protocolo único, mas não implicam a produção de produtos ou serviços (p. ex., exames) com qualidade. Para monitorar a adequação dos produtos ou serviços é necessário que eles sejam submetidos a controles intra e interinstitucionais de qualidade. O primeiro, denominado controle interno, é organizado dentro do próprio laboratório, por diversos processos disponíveis na literatura. Para o controle interinstitucional ou externo existem muitos centros de excelência e referência, no país ou no exterior, e, de modo geral, é realizado por intercâmbio de amostras. Todas as atividades de controle de qualidade, desde a calibração e manutenção preventiva e corretiva de equipamentos até os controles internos e externos, são documentadas de maneira clara e precisa, a fim de permitir as auditorias periódicas.

A avaliação do programa deve ser feita sistematicamente, por auditores (avaliadores) internos, e, em caso de laboratório credenciado pelo Inmetro, deve ser realizada também avaliação periódica por auditores externos de empresas certificadas.

O escopo do sistema de qualidade, ou seja, a sua abrangência, pode variar, mas deve garantir que todas as áreas que afetam a qualidade do produto ou serviço estejam cobertas pelo programa. No laboratório clínico, o almoxarifado, a lavagem, esterilização, preparação de reagentes e meios de cultura, emissão de laudos e coleta de material são tão importantes quanto as áreas técnicas especializadas e, portanto, deveriam sempre entrar no escopo do sistema de qualidade.

A existência de um programa de qualidade e, de modo ideal, o credenciamento junto ao Inmetro pode proporcionar um ganho qualitativo que resulte no êxito do laboratório dentro de um mercado altamente competitivo.

## ► Exames micológicos

O diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas requer a coleta de amostras biológicas apropriadas e procedimentos laboratoriais adequados segundo a indicação clínica. A qualidade da amostra disponível para análise laboratorial é de fundamental importância. Coleta, armazenagem e processamento de espécimes inadequados podem causar prejuízo econômico e levar a diagnóstico etiológico incorreto, com consequente atraso na introdução da terapia adequada.

Várias colorações e procedimentos são usados para detectar elementos fúngicos no exame direto de espécimes clínicos. Todos têm vantagens e desvantagens. Preparações “a fresco”

(sem emprego de corantes), com solução fisiológica, com KOH, com tinta da China ou colorações de Gram e Giemsa são as mais usadas no laboratório clínico. Também o calcoflúor, que requer microscópio fluorescente para a leitura dos preparados, pode ser empregado. Em nosso meio, o uso dessa substância é mais restrito. Outras colorações usadas de rotina em laboratórios não especializados em micologia são adequadas para a pesquisa de fungos. A impregnação pela prata, PAS (ácido periódico de Schiff) e HE (hematoxilina-eosina), usados em cortes histológicos, bem como a coloração de Papanicolaou em secreção vaginal, podem contribuir para o diagnóstico etiológico.

Atualmente, é grande a preocupação com os chamados fungos oportunistas, que atingem indivíduos com sistema imunológico comprometido ou sob fatores iatrogênicos. São diversas as doenças de base que predisõem o paciente às micoses oportunistas. Alguns gêneros despontam, nas últimas décadas, como novos agentes etiológicos (p. ex., *Fusarium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp., *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp., *Geotrichum* sp., fungos demácios) e somam-se aos tradicionais fungos oportunistas (*Candida* spp., *Cryptococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.), o que resulta em grandes desafios para o diagnóstico das infecções micóticas emergentes.

Estabelecer o diagnóstico de micoses oportunistas é tarefa árdua, que deve ser realizada com muito critério, a partir do trabalho conjunto entre laboratorista, clínico e patologista. Muitos aspectos devem ser relevados para que se chegue à conclusão diagnóstica. No laboratório, a ocorrência de resultado positivo em exame direto do material biológico, isolamento de fungo compatível com a estrutura observada ao exame direto e obtenção de culturas idênticas, a partir de amostras sequenciais do mesmo paciente são achados que indicam presença de micose oportunista. A demonstração do fungo em exame histológico, com invasão do tecido do hospedeiro, comprova, sem margem de dúvida, a participação do fungo no processo infeccioso. Mas a análise histológica pode, apenas, orientar para um determinado agente etiológico. Para a determinação correta da etiologia, são necessários o isolamento e a identificação do agente a partir da cultura do material biológico. Os métodos moleculares com aplicação no diagnóstico são, atualmente, utilizados na detecção precoce de muitas infecções fúngicas, devido à crescente prevalência de micoses invasivas e do período de tempo necessário para o diagnóstico quando são utilizados métodos microbiológicos clássicos. O método clássico, embora seja a pedra angular no diagnóstico das micoses, nem sempre permite a correta identificação do agente, o que resulta em problemas no diagnóstico e tratamento, em última análise. Esses métodos dependem de pessoal qualificado e experiente, tempo de crescimento em cultura do agente etiológico; não são quantitativos e, ainda, são propensos a contaminação e erros e, assim, muitas vezes resultam em demora do tratamento.

Na área de doenças infecciosas, a detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, se torna possível por meio das técnicas de biologia molecular; além disso, podem ser empregadas no monitoramento de doenças por meio da quantificação da infecção ou na determinação de resistência microbiana. Em micologia, os resultados desses ensaios podem ser úteis no diagnóstico, prognóstico e determinação da terapia a ser utilizada.



## ▪ Coleta e transporte de material biológico

Coleta, transporte e armazenamento de espécimes clínicos são etapas importantes que influenciam, decisivamente, o resultado do exame. Além disso, a qualidade de preenchimento dos dados solicitados na papeleta de requisição de exame micológico pode contribuir para a melhoria do serviço. Desse modo, dados clínicos podem sugerir determinados agentes etiológicos, orientando para exame direto “a fresco” ou corado e meio de cultura mais adequado. Informações sobre data, hora da coleta e uso de medicação não devem ser omitidas. O exame micológico completo deve contemplar sempre o exame direto e cultura, que devem vir solicitados na requisição.

Os espécimes biológicos devem ser obtidos sob condições de assepsia para diminuir a contaminação por fungos anemófilos e da flora normal. Material de micose superficial ou cutânea deve ser coletado com instrumentos previamente desinfetados com álcool ou esterilizados. Nesse caso, o paciente deve ser orientado para não usar medicação tópica na semana precedente ao exame, para evitar resultados falso-negativos. Pele, unha e lesão ulcerada devem ser higienizadas antes da coleta do material.

Todos os materiais devem ser acondicionados em frascos estéreis, e, dependendo do seu potencial de contaminação bacteriana, por exemplo, secreção brônquica e fezes, pode-se adicionar 0,2 mg de cloranfenicol para cada mL ou g de material.

Os materiais clínicos devem ser manuseados conforme normas de biossegurança e, de modo ideal, processados dentro de câmara de fluxo laminar classe II. Todos os espécimes clínicos devem ser transportados, o mais rápido possível, para o laboratório, de modo a evitar a multiplicação de eventuais contaminantes, fungos anemófilos e bactérias presentes no material biológico e facilitar o isolamento de fungos fastidiosos, como os fungos dimórficos. Amostras de urina que contenham leveduras da flora normal podem, em poucas horas, se multiplicar ou mesmo filamentar, levando a erros de interpretação dos achados ao exame direto. Espécimes com fatores microbicidas tais como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), pus, líquidos e secreções ricas em granulócitos podem diminuir a viabilidade do agente etiológico e, se houver escassez de fungos, podem gerar resultados falso-negativos. Fezes apresentam condições frequentemente tóxicas para fungos e podem resultar em discrepâncias na positividade ao exame direto e na cultura. As amostras biológicas ditas contaminadas, por exemplo, fezes, urina e pus, devem ser mantidas sob refrigeração até seu processamento. Material coletado com auxílio de *swab* deve ser umedecido com solução salina estéril para evitar a desidratação. Todos os materiais devem ser processados no dia da coleta, com exceção de pele, pelo e escamas de unha, os quais, desde que coletados em frascos secos, desinfetados ou esterilizados, podem permanecer à temperatura ambiente por alguns dias.

A indicação adequada do tipo de espécime clínico contribui para seu correto manejo durante o transporte. Secreções e líquidos coletados em tubos de ensaio tamponados com algodão devem estar contidos em sacos plásticos reforçados e transparentes para evitar derramamento, com consequente perda e contaminação do material.

Sangue e medula óssea devem ser semeados diretamente, da seringa para meio de cultura, na proporção de 6 a 10% do volume do meio. Meios tradicionais nas formas líquidas ou bifásicas são mais adequados para o isolamento dos agentes etiológicos.

No Quadro 32.2 estão sumarizados os principais espécimes clínicos relacionados com o local da infecção, a flora mais comum desses locais e os principais fungos encontrados como agentes infecciosos.

## ▪ Exame microscópico direto de espécimes clínicos

O exame micológico básico compõe-se de exame direto, com ou sem uso de corantes, e cultura do material biológico. O diagnóstico pode ser facilitado quando são observados no exame direto elementos fúngicos característicos para certos fungos, formas intracelulares de *Histoplasma capsulatum* em punção de medula ou em esfregaços sanguíneos, cistos de *Pneumocystis carinii*, esférulas típicas de *Coccidioides immitis*, formas multibrotantes com parede dupla refringente de *Paracoccidioides brasiliensis* etc. Por outro lado, a detecção de certas estruturas fúngicas em espécimes clínicos, como hifas largas não septadas ou hifas hialinas septadas dicotômicas, deve ser cuidadosamente observada para diferenciar contaminantes de fungos patógenos oportunistas. A presença dessas estruturas fúngicas no exame direto está fortemente associada a doença. A cultura positiva pode ser de um contaminante ou patógeno, e o exame direto pode ser crucial para decidir pelo início da terapia em infecções graves, como mucormicose ou aspergilose.

O resultado do exame direto deve refletir de modo objetivo todos os aspectos morfológicos observados. Alguns exemplos: blastoconídios (ou leveduras) em brotamento e/ou filamentando; formas leveduriformes com parede de duplo contorno; hifas septadas ou não septadas; formas leveduriformes intracelulares; leveduras capsuladas; esporos hialinos ou demácios (com coloração marrom).

Sempre que possível, o laboratorista deve indicar o agente etiológico ou a micose, como *Paracoccidioides brasiliensis*; formas sugestivas de *Histoplasma capsulatum*; leveduras capsuladas características de *Cryptococcus neoformans*; pitiríase versicolor; feo-hifomicose etc.

O exame direto apresenta limitações de várias ordens. Um resultado negativo ao exame direto não anula a hipótese de infecção fúngica. A sensibilidade do método varia de acordo com o sítio anatômico, o número de espécimes clínicos examinados, a adequação da coloração empregada, a qualidade da objetiva e do sistema óptico, o número de organismos, o estágio da doença, o tipo de paciente e a qualidade e a quantidade de material biológico coletado. O exame com tinta da China, por exemplo, tem sensibilidade de 70 a 95% na pesquisa de *Cryptococcus neoformans*, dependendo desses fatores. O exame direto tem sensibilidade insignificante para o diagnóstico de esporotricose e, portanto, não é recomendado. A pesquisa direta de *Histoplasma capsulatum* em amostras clínicas requer alta capacitação do laboratorista para alcançar sensibilidade aceitável. No entanto, a coloração de Giemsa facilita muito a visualização do agente e deve ser rotina obrigatória na suspeita de histoplasmose. O diagnóstico de paracoccidioidomicose, a partir de secreção pulmonar, tem melhor resolução quando o exame direto é realizado sem coloração, ou “a fresco”.

Por outro lado, exames falso-positivos podem ocorrer. Linfócitos lisados, ou pequenas bolhas de ar, em preparação de tinta da China de LCR podem ser confundidos com *C. neoformans*, fibras de colágeno simulam filamentos de actinomicetos, gotas de gordura apresentam refringência e tamanho semelhante ao das células de leveduras, estruturas



**Quadro 32.2 - Sítios topográficos de infecção, espécimes clínicos, flora e principais agentes etiológicos.**

Sítio da infecção	Espécimes clínicos	Flora	Fungos isolados em cultura
Região cutânea	Escama de pele; crosta de ferida; secreção de pústula ou fístula; tecidos obtidos por biopsia	Algumas espécies de leveduras e filamentosos	Frequentes: <i>Candida</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> Raros: <i>Cryptococcus</i> , <i>Malassezia furfur</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Paracoccidioides</i> ; <i>Histoplasma</i> ; agentes de cromoblastomicose e micetoma; <i>Coccidioides</i> , <i>Blastomyces</i>
Unha	Escamas de unha	Algumas espécies de leveduras e filamentosos	Frequentes: <i>Candida</i> , <i>Trichophyton</i> Raros: <i>Aspergillus</i> ; <i>Scopulariopsis</i> , <i>Paecilomyces</i> , feo-hifomicetos, <i>Fusarium</i>
Couro cabeludo e regiões pilosas	Fragmentos de pelos e cabelos	Algumas espécies de leveduras e filamentosos	Frequentes: <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> Raro: <i>Piedraia hortae</i> , <i>Trichosporon beigelii</i>
Região orbital	Humor aquoso, secreção ocular, tecido, escamas de epitélio	Nenhuma	<i>Candida</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Paracoccidioides</i> , <i>Fusarium</i> ; <i>Acremonium</i> ; feo-hifomicetos
Ouvido	Pus, secreção, escamas epidérmicas	Algumas espécies de leveduras e filamentosos	<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Rhizopus</i>
Região subcutânea	Pus, crostas, tecido, secreção ganglionar	Nenhuma	Frequentes: <i>Sporothrix</i> , <i>Paracoccidioides</i> , agentes de cromoblastomicose, micetomas, <i>Lacazia loboi</i> , <i>Candida</i> , <i>Blastomyces</i>
Mucosa nasal	Raspado, fluxo nasal, tecido	Algumas espécies de leveduras e filamentosos	Frequentes: zigomicetos, feo-hifomicetos, <i>Aspergillus</i> Raros: <i>Paracoccidioides</i> , <i>Rhinosporidium seeberi</i>
Genitália feminina, masculina e mucosa anal	Secreção, escamas epidérmicas, tecido	Leveduras	Frequentes: <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Paracoccidioides</i>
Orofaringe	Raspado, tecido	Leveduras	Frequentes: <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Paracoccidioides</i> Raros: <i>Histoplasma</i> , <i>Cryptococcus</i> , feo-hifomicetos, <i>Geotrichum</i> , <i>Saccharomyces</i>
Trato gastrointestinal	Fezes, lavado gástrico	Leveduras	Frequente: <i>Candida</i> Raros: <i>Histoplasma</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Paracoccidioides</i>
Trato respiratório	Escarro, escovado e lavado brônquico e broncoalveolar, aspirado transtraqueal, tecido, líquido pleural	Raras leveduras e filamentosos no trato respiratório superior	<i>Candida</i> sp. (em geral contaminante), <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Paracoccidioides</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Cryptococcus</i> Raros: <i>Sporothrix</i> , <i>Coccidioides</i> , <i>Blastomyces</i>
Sistema nervoso central	LCR e tecido	Nenhuma	Frequente: <i>Cryptococcus</i> Raros: <i>Candida</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Sporothrix</i> , feo-hifomicetos, zigomicetos, <i>Paracoccidioides</i>
Sistema hematopoético	Sangue e medula óssea	Nenhuma	<i>Histoplasma</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida</i> e outros
Sistêmica	Líquidos: sinovial, peritoneal e pericárdico; secreção ganglionar	Nenhuma	<i>Histoplasma</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Paracoccidioides</i> , <i>Candida</i> , <i>Blastomyces</i> , feo-hifomicetos, hialo-hifomicetos

em forma de mosaico assemelham-se a filamentos artrosporados de dermatófitos, sujidades simulam fragmentos de hifas de fungos demácios etc. Esses achados equivocados podem ser minimizados pela observação de mais de um preparado por amostra. De maneira geral, exames diretos são menos sensíveis do que culturas, porém, materiais biológicos de pacientes sob tratamento podem apresentar formas inviáveis do agente etiológico na pesquisa direta que não têm capacidade de crescer em meios de cultura, resultando em culturas negativas. Nesses casos, ou quando houver fatores que inibam o crescimento *in vitro*, tais como alta concentração de antifúngicos no material biológico, o exame direto terá maior sensibilidade que a cultura. A cultura não tem valor para *Lacazia loboi*, cuja forma parasitária, *in vitro*, ainda não foi obtida nos meios tradicionais de cultura.

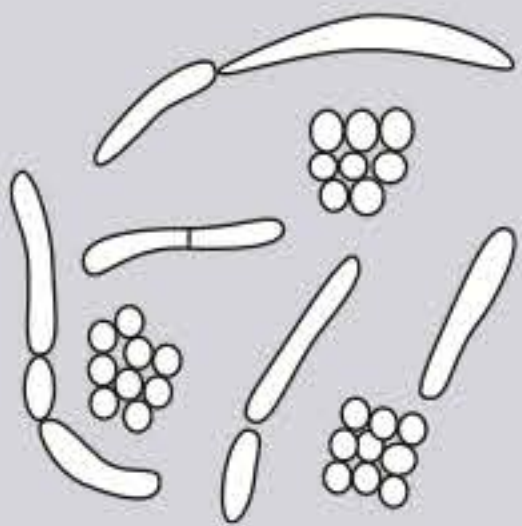
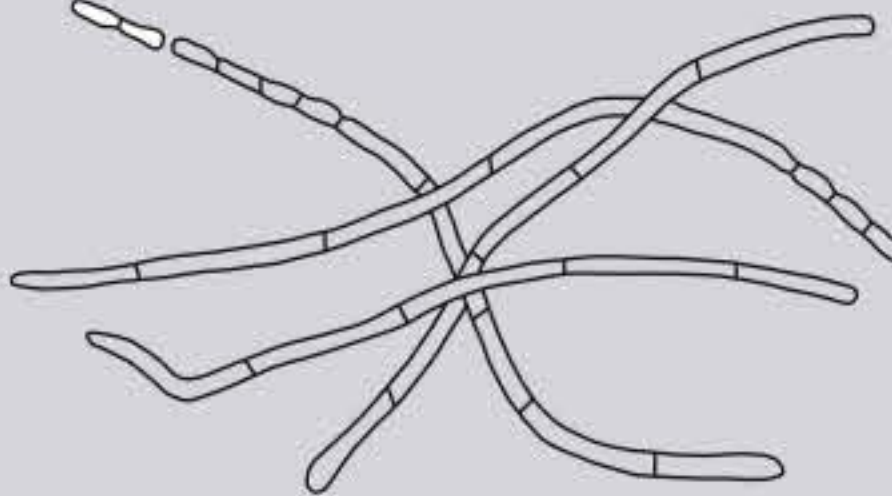
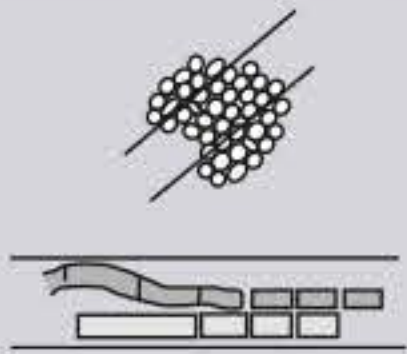

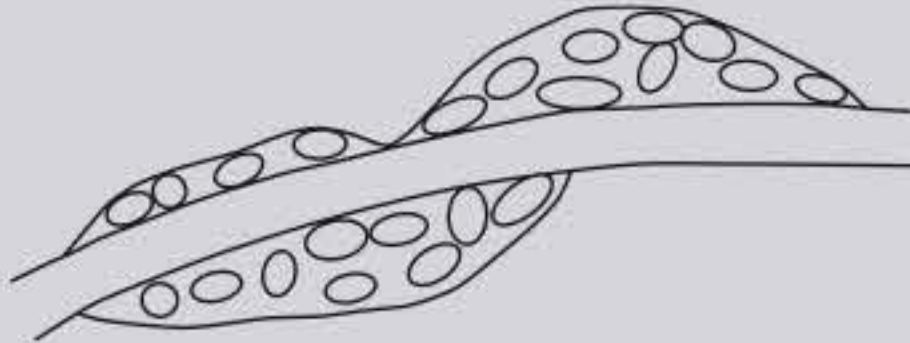
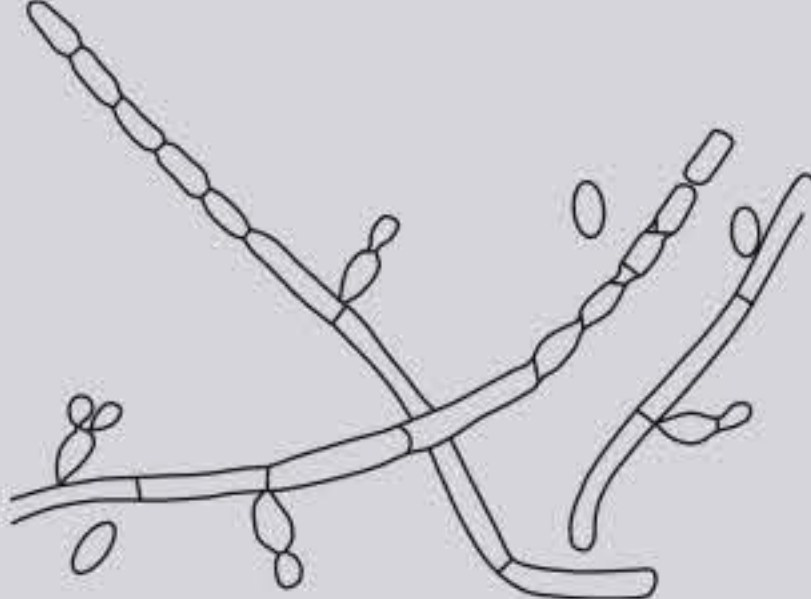
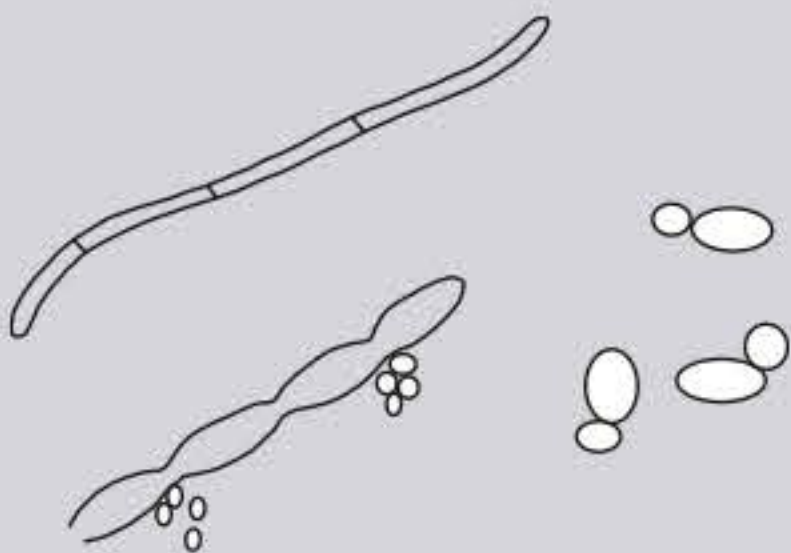
O diagnóstico presuntivo de criptococose, paracoccidioidomicose, candidíase, dermatofitose, pitiríase versicolor, pedras, cromoblastomicose, feo-hifomicose e micetoma é, em regra, realizado por meio do exame direto, desde que dentro de normas de qualidade. A esporotricose é, talvez, a única micose em que o exame direto não é recomendado, conforme visto, devido à baixa sensibilidade do método.

Além de sua alta sensibilidade, o exame direto é importante para orientar na utilização de meio de cultura e temperatura mais adequadas, ao isolamento do agente etiológico presumido e na pesquisa direta do material biológico. Assim, uma secreção respiratória que contenha formas sugestivas de *Cryptococcus neoformans* indica o uso de meios presuntivos com compostos fenólicos para o isolamento do agente. Por outro lado, a visualização de *P. brasiliensis* ou *H. capsulatum* orientam para o uso de meios nutritivos como BHI (infusão de cérebro-coração), pois são fungos fastidiosos. O exame direto nesse aspecto contribui para solucionar um problema muito frequente na rotina do laboratório de micologia: as solicitações de pesquisa de fungos sem especificar o agente ou o grupo de agentes etiológicos possíveis.

No Quadro 32.3 estão esquematizadas e descritas estruturas fúngicas encontradas ao exame direto e seus respectivos agentes etiológicos, para suporte ao diagnóstico das micoses. Ainda neste capítulo, serão fornecidas descrições mais pormenorizadas de cada infecção micótica, com detalhamento das estruturas formadas *in vitro* dos agentes etiológicos que complementam o diagnóstico micológico.



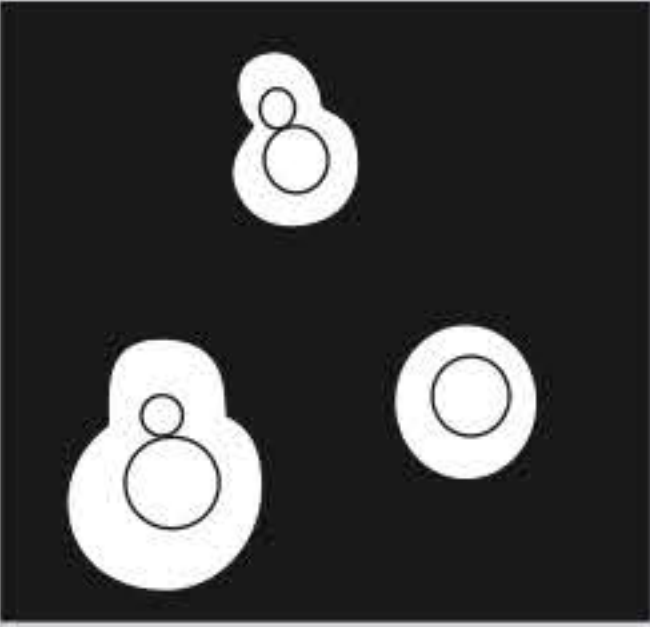
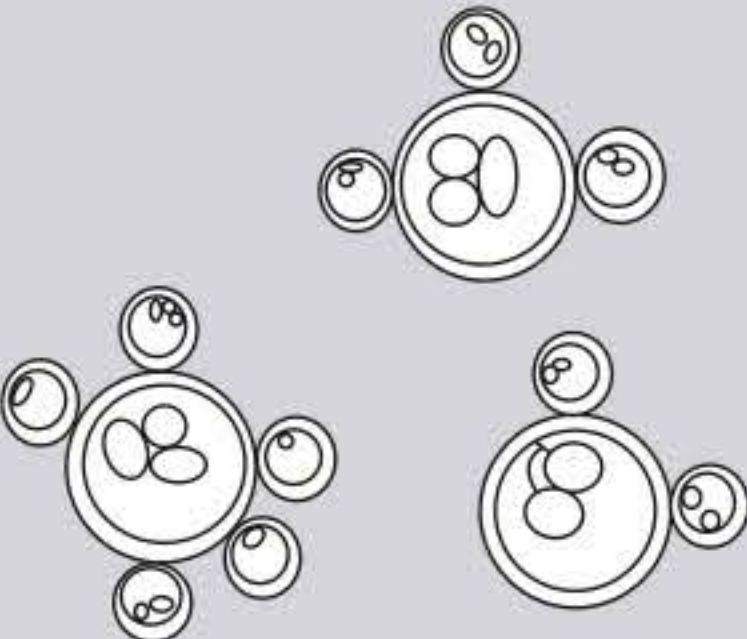

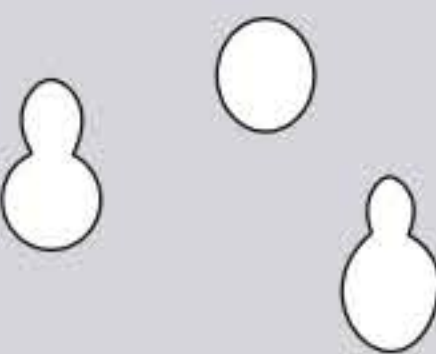


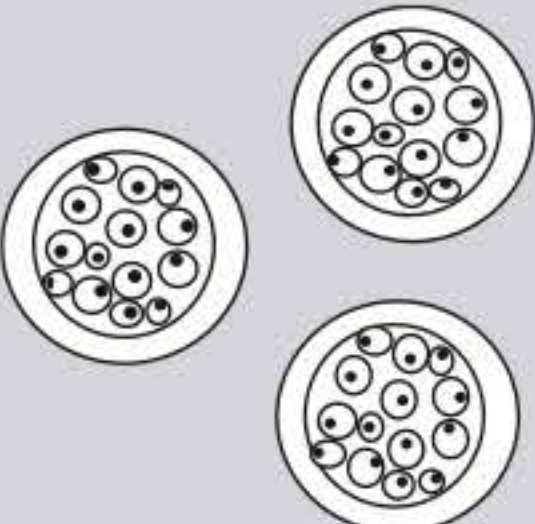
**Quadro 32.3 - Aspectos morfológicos de fungos de interesse médico em exame direto do espécime clínico e respectivas doenças.**

Estrutura	Descrição	Agente etiológico	Micose
<p>Leveduras e hifas</p> 	Células arredondadas de parede espessa (3 a 8 µm) dispostas em cachos; hifas curtas (2,5 a 4 µm), irregulares, pouco ramificadas	<i>Malassezia furfur</i>	Pitíriase versicolor
<p>Hifas hialinas septadas</p> 	Hifas hialinas septadas (3 a 15 µm), cadeias de artroconídios	Dermatófitos (pele e unhas)	Dermatofitose de pele glabra ou unhas
<p>Hifas hialinas septadas, cadeias de conídios</p> 	Cadeia de conídios na periferia de pelos (parasitismo tipo ectótrico), hifas em fragmentação; artroconídios (endótrico); hifas longas ou túneis, bolhas (fávido)	Dermatófitos	Dermatofitose de pelos
<p>Nódulos de cor escura (ascostroma)</p> 	Nódulos de cor escura com áreas claras contendo ascósporos	<i>Piedraia hortai</i>	Piedra preta
<p>Nódulos de cor clara</p> 	Nódulos de cor clara, com hifas hialinas, fragmentando-se em artroconídios	<i>Trichosporon beigeli</i>	Piedra branca
<p>Leveduras, hifas, artroconídios</p> 	Hifas e artroconídios redondos ou retangulares (2 a 8 µm)	<i>Trichosporon</i> sp.	Tricosporonose
<p>Leveduras, pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras</p> 	Células ovaladas, arredondadas (3 a 4 µm) com brotamento único; pseudo-hifas, blastoconídios unidos (5 a 10 µm) formando constrição no local de união; hifas verdadeiras contínuas	<i>Candida albicans</i> e outras	Candidíase

continua



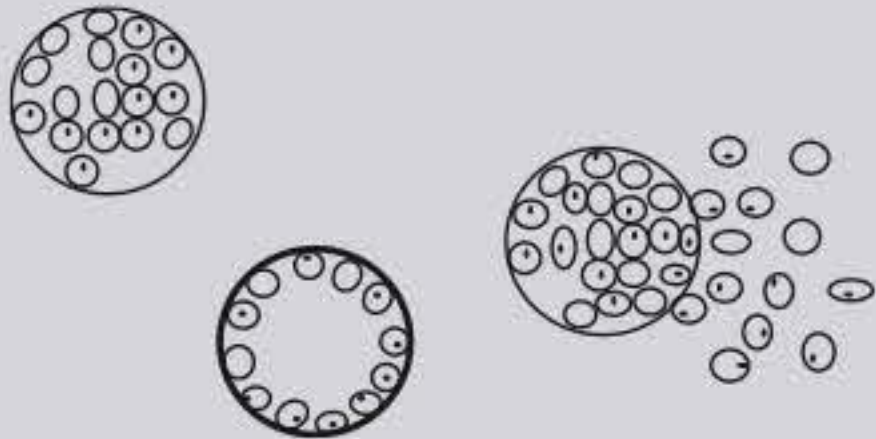
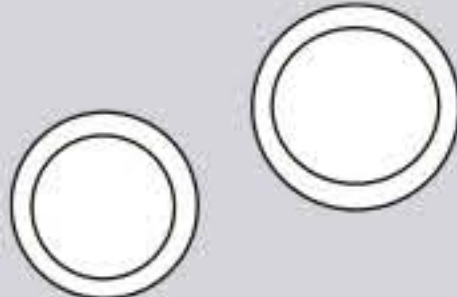

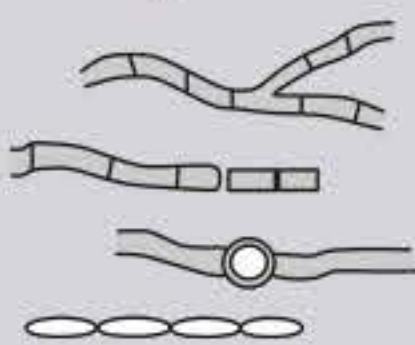
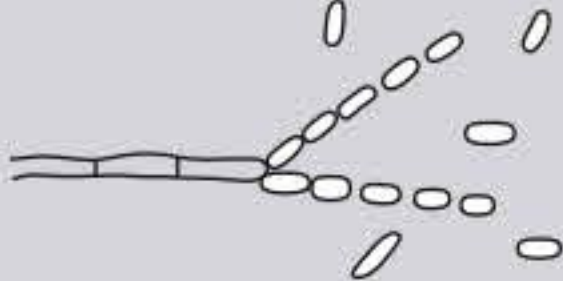

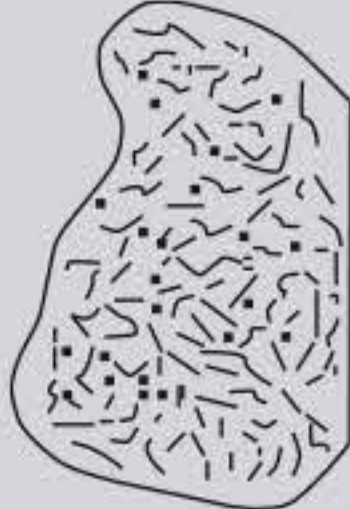

**Quadro 32.3 - Aspectos morfológicos de fungos de interesse médico em exame direto do espécime clínico e respectivas doenças (continuação).**

Estrutura	Descrição	Agente etiológico	Micose
Leveduras 	Células esféricas, tamanho variável (2 a 15 µm), broto único ou múltiplo; cápsula de diferentes tamanhos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Criptococose
Leveduriforme 	Células ovais a redondas, com multibrotamento, tamanho variável (5 a 60 µm); parede espessa refringente, inclusões citoplasmáticas; às vezes blastoconídios isolados ou em pequenas cadeias	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicose
Leveduriforme 	Células ovaladas ou arredondadas, de mesmo tamanho (7 a 12 µm), parede espessa, em cadeias com pontes aparentes	<i>Lacazia loboi</i>	Blastomicose queloidiana
Leveduriforme 	Células ovaladas a arredondadas (8 a 15 µm), parede refringente, blastoconídio único ligado à célula-mãe por base larga	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Blastomicose
Leveduriforme 	Formas leveduriformes intracelulares, (macrófagos, histiócitos, monócitos), em geral gemulação única; ovais ou arredondadas (2 a 5 µm), circundadas por halo claro	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmose
Leveduriforme 	Células raras em forma de naveta, "charuto" ou ovais (2 a 6 µm), brotamento simples ou múltiplo	<i>Sporothrix schenckii</i>	Esporotricose
Esporângios 	Esporângios (6 a 300 µm) de paredes espessas contendo milhares de endosporos (6 a 9 µm) ou esporangiosporos	<i>Rhinosporidium seeberi</i>	Rinosporidiose

continua



**Quadro 32.3 - Aspectos morfológicos de fungos de interesse médico em exame direto do espécime clínico e respectivas doenças (continuação).**

Estrutura	Descrição	Agente etiológico	Micose
<b>Esférulas</b> 	Esférulas (10 a 80 µm) de paredes espessas, vazias ou repleta de endosporos (2 a 4 µm)	<i>Coccidioides immitis</i>	Coccidioidomicose
<b>Adiaconídios</b> 	Esférulas (150 a 300 µm) de paredes espessas (20 a 70 µm); adiaconídios vazios raramente, contendo inclusões (1 a 3 µm)	<i>Emmonsia parva</i>	Adiaspiromicose
<b>Células escleróticas</b> 	Células demácias (4 a 12 µm) de cor castanha, agrupadas como pilhas de moedas, reprodução por fissão	<i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>F. compacta</i> , <i>Rhinochlamydia aquaspersa</i> , <i>Cladophialophora carrioni</i>	Cromoblastomicose
<b>Hifas septadas demácias</b> 	Hifas demácias polimorfas (2 a 6 µm); eventualmente clamidoconídios intercalares, artroconídios e blastoconídios em cadeias	<i>Phialophora</i> sp., <i>Exophiala</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp., <i>Curvularia</i> sp., <i>Exserohilum</i> sp., <i>Wangiella dermatitidis</i> , <i>Cladophialophora bantiana</i> , <i>Hortaea werneckii</i>	Feo-hifomicose
<b>Hifas e artroconídios</b> 	Hifas hialinas septadas (4 a 12 µm), artroconídios retangulares, raramente esféricos e polimorfos	<i>Geotrichum</i> sp.	Geotricose
<b>Hifas septadas hialinas</b> 	Hifas hialinas (3 a 12 µm) ramificadas em "Y" (dicotomizadas)	Hialo-hifomicetos: <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Hialo-hifomicose: aspergilose, fusariose
<b>Grãos</b> 	Hifas septadas entrelaçadas formando grão (65 a 1.000 µm). As hifas podem ser hialinas ou demácias	<i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> etc.	Eumicetoma
<b>Grãos</b> 	Filamentos finos (1 µm de diâmetro) ramificados, irregulares, fragmentando-se em formas cocoides e bacilares, entrelaçados, de cor e forma variados (25 a 500 µm)	Actinomicetos <i>Nocardia brasiliensis</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces bovis</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	Actinomicetoma

O ideal seria que o exame direto fosse dirigido para o grupo de agentes etiológicos sugeridos pela suspeita clínica. No entanto, a grande maioria das infecções fúngicas não apresenta sintomas patognomônicos e, deste modo, nem sempre é possível haver indicação da hipótese diagnóstica da suspeita clínica. A solicitação ampla e inespecífica dificulta a pesquisa dirigida e pode, algumas vezes, comprometer a qualidade do exame micológico e representar prejuízo econômico, com gasto desnecessário de reagentes, além de atraso no resultado.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade do exame direto, os materiais biológicos para pesquisa de fungos devem ser submetidos a um ou mais dos seguintes processos: mucólise, centrifugação e clarificação. Deve-se notar, no entanto, que a clarificação com hidróxido de potássio (KOH) resulta na destruição progressiva das hifas e esporos, inviabilizando assim o isolamento do agente em meios de cultura. Portanto, vale lembrar que porções distintas do material biológico devem ser destinadas ao exame direto e à cultura. No Quadro 32.4 são indicados os procedimentos recomendados para exame direto de diferentes espécimes clínicos.



**Quadro 32.4 • Processamento de espécimes clínicos para pesquisa de fungos.**

Material	Preparo	Exame direto	Meio de cultura	Incubação <sup>4</sup>	
				T (°C)	t (semanas)
Pele, unha, pelo, cabelo	Aquecimento leve com 1 gota de solução aquosa de KOH a 30% <sup>1</sup>	-	ASD <sup>2</sup> e ágar seletivo para fungos patogênicos <sup>3</sup>	30	2
LCR <sup>5</sup>	Centrifugação a 2.000 rpm/15'	1 gota sedimento + gota de tinta da China	ASD e ágar niger	30	2
Secreção vaginal, uretral, mucosa oral	Extensão em lâmina ou eluição em solução fisiológica, centrifugação a 2.000 rpm/15'	Coloração Gram ou "a fresco"	ASD	30	2
Secreção do trato respiratório	Centrifugação após tratamento com substâncias mucolíticas	Gotas sedimento para: ▪ "Exame a fresco", tinta da China ▪ Coloração Gram ▪ Coloração Giemsa	ASD Ágar BHI	30	4
Outras secreções, pus	Esfregaço com lâmina	▪ "Exame a fresco" ▪ Coloração Gram ▪ Coloração Giemsa	ASD Ágar BHI	30	4
Tecidos	<i>Imprint</i> ▪ Maceração <sup>6</sup>	▪ Coloração Giemsa ▪ "Exame a fresco"	ASD Ágar BHI	30	4
Urina	Centrifugação a 2.000 rpm/15' ou 0,1 mL de urina para cultura	Gotas de sedimento: coloração de Gram	ASD Placa com ágar Sabouraud para contagem de ufc/mL	30 30	2 1
Fezes	Suspensão em solução de antibiótico, centrifugação 2000 rpm/15'	Gotas do sedimento: ▪ "Exame a fresco" ▪ Coloração de Gram	ASD	30	2
Aspirado de medula óssea	Extensão em lâmina	Coloração de Giemsa	Ágar BHI	30	6
Sangue	3 mL sem anticoagulante	-	Coletado em meio bifásico (BHI) (agitação diária)	30	6

<sup>1</sup>KOH + dimetil sulfoxido pode ser usado/sem aquecimento. <sup>2</sup>Ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol (ASD). <sup>3</sup>Em caso de suspeita clínica de pitíriase versicolor, o meio de cultura deve ser coberto com camada de óleo de oliva esterilizado antes da semeadura do material biológico e incubado a 37°C. <sup>4</sup>T = temperatura; t = período de incubação. <sup>5</sup>Líquido cefalorraquidiano. <sup>6</sup>Em caso de impossibilidade de maceração, deve-se semear o tecido também em caldos BHI e Sabouraud.

## ▪ Exame histopatológico

O diagnóstico de uma doença fúngica pode ser realizado a partir de um resultado histopatológico, mas a confirmação do agente etiológico só é possível após isolamento e identificação do fungo. *Pneumocystis jirovecii carinii* pode ser também pesquisado por exame histológico. Porém, o exame histológico representa uma das possibilidades de diagnóstico para rinosporidiose (*Rhinosporidium seeberi*, reclassificado como protista, não é, portanto, fungo) e blastomicose queloidiana (*Lacazia loboi*), pois o cultivo *in vitro* desses agentes etiológicos ainda não foi definido.

Exames histológicos são relevantes para confirmar a invasão de tecidos por fungos, habitualmente, anemófilos e saprófitas, tais como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Rhizopus*. Esfregaços de material biológico positivos para fragmentos de hifas também indicam o envolvimento desses agentes oportunistas em processo infeccioso.

Os procedimentos histológicos são rápidos e relativamente baratos, e podem resultar em diagnóstico presuntivo, já que os fungos apresentam morfologia e propriedades tintoriais características. A coloração de hematoxilina-eosina (HE), usada

rotineiramente em laboratórios de patologia, não é adequada para detectar elementos fúngicos. Muitos fungos coram-se pobremente e alguns não o fazem com HE. No entanto, a resposta tecidual pode ser mais bem observada e avaliada. Nessa coloração, a cor típica amarronzada dos elementos fúngicos demácios se mantém, o que facilita sua observação. Hifas hialinas podem assumir tonalidade azulada, facilitando sua detecção. Certos tipos de reações teciduais podem sugerir a presença do fungo, como necrose tissular em criptococose, granuloma em eumicetoma e corpos asteroides em esporotricose, mas, de modo geral, não há reação inflamatória característica para um agente em particular.

Colorações especiais para fungos, como a técnica de impregnação pela prata (Gomori), Gridley e PAS (ácido periódico de Schiff), são mais indicadas que a HE para detecção e análise de sua morfologia tecidual. A maioria dos patologistas prefere a coloração de Gomori, pois permite bom contraste entre tecidos e elementos fúngicos. As células fúngicas, viáveis ou não, adquirem coloração marrom-escuro, e como contra-corante é geralmente utilizado o verde ou amarelo brilhante. Alguns laboratórios utilizam a combinação dos métodos Gomori e HE.



Na reação com PAS, as células fúngicas são coradas em vermelho e a visualização é relativamente fácil. As colorações de mucicarmim de Mayer e azul alcian são utilizadas na suspeita de criptococose. A cápsula mucopolissacarídica cora-se, respectivamente, de vermelho ou azul. *Rhinosporidium seeberi* e algumas células de *Blastomyces dermatitidis* são também coradas pelo método de mucicarcim, mas estes apresentam características morfológicas totalmente distintas de *C. neoformans*.

## ■ Cultivo de espécimes clínicos

Os materiais biológicos devem ser submetidos a determinados processos antes do seu cultivo em meios de cultura, de modo a permitir maior sensibilidade no exame. Os processos de centrifugação aumentam consideravelmente a positividade da cultura, bem como o tratamento mucolítico ou a maceração de tecido, que permitem a liberação dos agentes etiológicos para que tenham maior contato com a superfície do meio. No Quadro 32.4 são descritos os procedimentos recomendados e os respectivos meios de cultura, conforme o material biológico. A temperatura e o período de incubação permitem o crescimento dos fungos mais relacionados com os espécimes clínicos.

O acondicionamento dos meios de cultura pode ser feito em tubos ou placas de Petri. Os meios contidos em tubos apresentam taxa de desidratação mais lenta e têm menor probabilidade de contaminação por fungos anemófilos durante a estocagem, incubação e/ou manipulação. O trabalho de semeadura é sempre realizado em condições assépticas, com luvas e máscaras e, preferentemente, dentro de cabina de fluxo laminar de classe II. Os espécimes clínicos processados devem ser autoclavados previamente antes de serem desprezados.

As culturas para fungos-leveduras ou filamentosos são incubadas, em geral, à temperatura de 30°C; 25°C é aceitável, embora alguns organismos possam se multiplicar mais lentamente a esta temperatura. Algumas espécies de leveduras crescem melhor a 30°C que a 37°C, de modo que essa temperatura favorece seu isolamento primário a partir do material biológico. Por outro lado, culturas para *Actinomyces* devem ser realizadas a 37°C e em condições de anaerobiose ou microaerofilia. A incubação a 37°C permite o crescimento adequado de fungos, porém agentes oportunistas, em geral contaminantes ambientais, podem apresentar dificuldade para se desenvolver e esporular sob esta temperatura. Os fungos dimórficos

podem ser isolados à temperatura de 30°C (fase micelial) e seu subcultivo, quando colocado a 37°C, permite a conversão à fase leveduriforme. A temperatura de 37°C para isolamento primário de fungos a partir de materiais considerados contaminados, tais como secreção respiratória, urina, fezes, secreção vaginal etc., estimula a multiplicação bacteriana e diminui a sensibilidade da cultura.

Taxas de crescimento dependem da espécie do agente etiológico, do processamento prévio do espécime clínico, tipo e qualidade do meio de cultura empregado, da temperatura de incubação e presença de inibidores no espécime clínico. O cultivo primário de leveduras pode ocorrer em 24 h, mas alguns fungos dimórficos demoram até 30 dias para mostrar crescimento visível na superfície do meio de cultura. Para diminuir o risco de resultados falso-negativos, os tubos de cultivo devem ser incubados pelos prazos recomendados no Quadro 32.4 antes de serem descartados como negativos. Quando houver suspeita de paracoccidioidomicose ou histoplasmoses, a cultura deve ficar incubada, no mínimo, por 8 semanas. No Quadro 32.5 estão classificados os principais fungos de interesse médico, segundo o período médio de crescimento.

O êxito no isolamento primário de fungos de importância médica depende de múltiplos fatores. O primeiro está relacionado com o próprio espécime clínico; este deve ter sido coletado recentemente, e deve ser compatível com a suspeita clínica. Muitas vezes, o tipo de material coletado compromete a qualidade do exame. Por exemplo, líquidos estéreis contidos em vesículas não são tão adequados para o diagnóstico de dermatofitose, crostas de lesões não se prestam à pesquisa de esporotricose, escamas do couro cabeludo não devem ser processadas para diagnóstico de tinea do couro cabeludo etc.

A qualidade do espécime a ser cultivado também é importante. Em geral, no hospedeiro imunocompetente, há poucas células fúngicas no local de infecção, sendo assim necessário o cultivo de um volume adequado do material para assegurar o isolamento do agente etiológico. Material de pele proveniente de micose cutânea deve ser coletado das bordas das lesões, onde estão estruturas com maior viabilidade; fragmentos de pelos e cabelos tonsurados apresentam maior parasitismo, o que aumenta as chances de isolamento do agente etiológico; escamas obtidas por raspagem da parte interna da unha permitem melhor diagnóstico de onicomicose do que fragmentos cortados com tesoura.

**Quadro 32.5 - Período médio de crescimento dos principais fungos de interesse médico.**

Período de crescimento	Bolores	Leveduras	Bactérias
Até 6 dias ou menos: crescimento rápido	<i>Absidia</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Drechslera</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Sepedonium</i> , <i>Syncephalastrum</i> , <i>Trichoderma</i> , fase M de <i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Trichosporon</i> , fase L de <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Blastomyces</i> (subcortivos)	<i>Actinomyces</i> (anaeróbios), <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i>
6 a 10 dias: crescimento intermediário	<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. nanum</i> , <i>M. distortum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> Outros: <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Coccidioides immitis</i>	Fase L de <i>Histoplasma capsulatum</i>	
11 a 21 dias: crescimento lento	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>Cladosporium carrionii</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Fonsecaea</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Fase L de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (isolamento primário)	



A escolha do meio de cultura depende, em parte, da suspeita clínica e do resultado do exame direto. O ágar Sabouraud (glicose, 40 g, peptona, 10 g, ágar, 20 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 5,5 a 5,6) adicionado de cloranfenicol (ASD) é o meio clássico em micologia, pois permite o crescimento adequado da grande maioria dos fungos de interesse médico. Porém, para fungos fastidiosos como os dimórficos, deve-se usar ágar infusão cérebro-coração (37 g, glicose, 20 g, ágar, 20 g e água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 7,4) com cloranfenicol, acrescido ou não de sangue. Na pesquisa de fungos fastidiosos recomenda-se usar mais de um tipo de meio de cultura, para aumentar a sensibilidade do exame. Para inibir bactérias e recuperar fungos dimórficos pode-se usar também ágar extrato de levedura-fosfato com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Como a identificação da maioria dos fungos filamentosos se baseia em sua morfologia relacionada com a esporulação, o uso de meios de cultura que favorecem a formação de esporos é recomendado para o exame. Por exemplo, o ágar batata-dextrose (batatas descascadas, 200 g, tampão fosfato, 2 mL, ágar, 20 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 5,6 a 5,8) com cloranfenicol pode ser usado para isolar dermatófitos. Podem-se usar meios presuntivos que contenham compostos fenólicos, como L-dopa, ácido cafeico e ágar niger, para isolar *Cryptococcus* sp. Meios com ácidos graxos, como, por exemplo, ASD com 10% de azeite de oliva, são necessários para isolar *Malassezia furfur*, levedura lipofílica estrita. Na suspeita clínica de dermatofitose, um meio presuntivo denominado DTM (*dermatophyte test medium*) pode ser usado, com a vantagem de impedir o crescimento de anemófilos e indicar alteração de pH na presença de dermatófitos. O meio de Lowenstein-Jensen é usado para *Nocardia*. O meio ASD com cloranfenicol e cicloeximida também é indicado para isolar dermatófitos.

O cloranfenicol (100 mg ou 200 mg/L, conforme o material) é o antibiótico antibacteriano de escolha no laboratório de micologia por ter amplo espectro e ser autoclavável sem perda de atividade, sendo prática sua adição aos meios de cultura. A cicloeximida (50 mg/L) é uma substância que inibe a maioria dos fungos anemófilos – *Aspergillus*, *Fusarium* etc. –, adicionada a meios destinados ao isolamento primário de fungos patogênicos. Porém, com o advento dos fungos oportunistas, o emprego indiscriminado de meios com essa substância pode impedir o isolamento dos agentes emergentes, com prejuízo para o diagnóstico da infecção. Além disso, impede o crescimento de *C. neoformans*, *Pseudallescheria boydii*, algumas espécies de *Candida* e de fungos dimórficos na fase leveduriforme cultivados a 37°C, entre outros (Quadro 32.6).

Todos os cultivos devem ser examinados diariamente, ou, no mínimo, 3 vezes/semana, durante o período de incubação. Micologistas experientes podem identificar gêneros de fungos já no seu isolamento primário, especialmente se, no caso de fungo filamentoso, houver esporulação adequada. Para tanto, é realizado o exame macroscópico e microscópico da cultura. Porém, a identificação completa é feita somente a partir de novos cultivos em outros meios de cultura e, para leveduras, há necessidade de testes fisiológicos em adição às características morfológicas.

## ■ Recomendações práticas para a melhoria dos exames micológicos

Os meios de cultura devem ser mantidos cobertos, em posição vertical, para evitar que a água de condensação umedeça os tampões. Tampão de algodão hidrófobo é preferível

### Quadro 32.6 - Agentes patogênicos inibidos por cicloeximida e cloranfenicol.

Inibidos por cicloeximida	Inibidos por cloranfenicol	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Nocardia asteroides</i> <sup>2</sup>
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>2</sup>	<i>N. brasiliensis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Outras bactérias; fase L de fungos dimórficos <sup>1</sup>
<i>C. krusei</i>	<i>Geotrichum</i> sp.	
<i>C. tropicalis</i>	<i>Scopulariopsis</i> sp.	
<i>C. rugosa</i>	<i>Saccharomyces</i> sp.	
<i>C. glabrata</i>	<i>Absidia</i> sp.	
Fase L de fungos dimórficos <sup>1</sup>	<i>Mucor</i> sp.	
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	
<i>Nocardia</i> sp.	<i>Pseudallescheria</i>	

<sup>1</sup>A fase leveduriforme é inibida somente a 37°C, e não a 30°C. <sup>2</sup>Parcialmente inibidos.

ao hidrófilo. Meios estocados à temperatura ambiente, em armário fechado, têm menor taxa de desidratação do que sob refrigeração. A ausência de refrigeração permite também o desenvolvimento de fungos contaminantes nos meios de cultura que, eventualmente, apresentem problemas na esterilização ou tamponamento. Recomenda-se que os meios de cultura permaneçam sob observação durante 15 dias, antes de serem utilizados para semeadura de materiais biológicos, dentro de um programa de controle de esterilidade.

Todos os lotes de meios destinados à cultura de fungos, provas fisiológicas e bioquímicas, devem ser testados previamente, com cepas padrão, antes de serem utilizados.

Reagentes e corantes, frequentemente, são contaminados com leveduras e fungos filamentosos do meio ambiente. Os fungos, em geral, não necessitam de nutrientes especiais e se multiplicam em soluções usadas de rotina no laboratório. A tinta da China pode ser contaminada inadvertidamente, com *Cryptococcus neoformans*, a partir de material biológico infectado. Isso pode ocorrer se, na preparação do exame direto, a tinta for colocada sobre o material biológico, contaminando a ponta do frasco goteador do corante.

O controle diário da temperatura de estufas de incubação, em particular os de uso em espécimes de sangue e medula óssea, permite maior eficácia no isolamento de *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*.

## ► Identificação de culturas de fungos

A cultura primária de um agente etiológico a partir de seu isolamento do material biológico deve ser prontamente repassada para um novo meio de cultura, por meio de repique com alça de níquel-cromo. Desse modo, é aumentada a viabilidade da cultura, mantendo-a na fase logarítmica de crescimento e com novos nutrientes, além de minimizar a contaminação das colônias por fungos anemófilos eventualmente presentes no material. Ocorre, com maior frequência para materiais biológicos considerados contaminados, o isolamento de colônias com distintas morfologias, o que denota o crescimento de mais de um tipo de fungo. Pode ser difícil, em particular para laboratoristas menos experientes, decidir, nesse momento, qual é o possível agente etiológico e qual colônia pode ser desprezada.



Recomenda-se proceder, então, ao isolamento e identificação de todas as colônias morfológicamente distintas até a definição do provável agente etiológico.

A cultura primária pode conter, simultaneamente, leveduras e fungos filamentosos. A aparência de levedura é cremosa, pastosa, em geral, de cor clara. Os filamentosos, em geral, são cotonosos e com coloração mais variada. Existem exceções, como no caso de *Aureobasidium*, *Exophiala* e *Sporothrix schenckii* que, no primeiro isolamento, têm textura semelhante à de leveduras e em subcultivos crescem como filamentosos.

O plaqueamento da cultura primária é primordial sempre que se tratar de levedura. O procedimento pode ser feito em estrias e por esgotamento da alça, em meio e temperatura idênticos aos usados para seu cultivo primário. Para purificar uma cultura mista de levedura, pode-se preparar também uma suspensão das células em salina ou água destilada e semeá-la na superfície de meio distribuído em placas de Petri. Se uma das leveduras suspeitas for *Cryptococcus neoformans*, deve-se fazer o plaqueamento em meio presuntivo para esta levedura, como por exemplo, ágar niger (extrato de sementes de niger, 200 mL, glicose, 1 g, solução de difenil, 10 mL, preparada com 0,1 g/10 mL de álcool etílico a 95%, ágar, 20 g, água destilada q.s.p. 1.000 mL; pH final, 5,5); as colônias se distinguem pela formação de melanina e consequente coloração marrom.

Culturas mistas de fungos filamentosos, ou culturas que contenham bolores e leveduras, ou mesmo bactérias, podem ser descontaminadas também com o auxílio de plaqueamento em placa de Petri. Às vezes, o processo deve ser repetido várias vezes até o completo isolamento do agente.

Com a cultura pura do agente, tem início a sua identificação. Os fungos são identificados com base em critérios de taxa de crescimento, morfologia da colônia, morfologia microscópica, e, no caso de leveduras, por meio de provas fisiológicas.

## ■ Fungos filamentosos

### Aspectos de observação macroscópica da colônia

As colônias dos fungos filamentosos nem sempre apresentam morfologia característica de determinado gênero ou espécie, mas os aspectos macroscópicos podem ser importantes para complementar sua identificação. Assim, textura, topografia da colônia, cor e outras características devem ser observadas.

#### Textura

A textura da colônia é resultante do conjunto de hifas (micélio) aéreas e pode ter os seguintes aspectos:

- Cotonosa ou algodonosa, com micélio aéreo volumoso e proeminente
- Velutínea, com micélio aéreo aderente à superfície do meio e de aspecto aveludado
- Granular ou pulverulenta, com superfície plana, friável, que se fragmenta com facilidade devido à intensa produção de conídios
- Glabrosa ou cérea, com superfície lisa e micélio aéreo escasso; algumas colônias de leveduras também têm essa aparência.

#### Topografia

A topografia da colônia é, muitas vezes, mascarada pelo micélio aéreo; assim, esta característica é mais bem observada no reverso da colônia. A colônia pode ser plana, sem sulcos

ou rugosidades, ou, por outro lado, pode apresentar uma das seguintes características:

- Rugosa, com profundos sulcos, estrias ou ranhuras distribuídas de modo irregular a partir do centro da cultura
- Umbilicada, com elevação central, podendo conter estrias
- Verrucosa, com dobras e superfície ondulada.

#### Cor

A cor exata do verso e anverso da colônia e a presença de anéis concêntricos de diferentes cores são aspectos a serem observados.

#### Dimorfismo

O dimorfismo é um dos critérios mais úteis na identificação de fungos patogênicos. A maioria dos fungos dimórficos depende da temperatura para se desenvolver na fase leveduriforme (a 37°C) ou na filamentosa (de 25 a 30°C). *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Blastomyces dermatitidis* são exemplos de fungos que apresentam esse dimorfismo térmico.

Para a obtenção da fase leveduriforme desses fungos deve-se semear a forma filamentosa em meio de ágar BHI-sangue, ágar Fava Netto ou ágar BHI-cisteína e cultivá-lo a 37°C, de preferência em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 1 a 3 semanas. Frequentemente, subcultivos são necessários para a obtenção de forma leveduriforme típica. Em muitos isolados, especialmente *H. capsulatum*, pode ser difícil a conversão *in vitro*. *Coccidioides immitis* e membros do gênero *Emmonsia* são dimórficos, mas não produzem formas leveduriformes a 37°C. *C. immitis* produz esférulas somente em meio especial de cultura, e as duas variedades de *Emmonsia parva* produzem adiacônídios de parede espessa a 37°C, mas não se reproduzem.

### Aspectos da morfologia microscópica

As formas, tamanhos e disposição dos propágulos, anamorfos (assexuados) ou teleomórficos (sexuados), são a base de identificação dos fungos filamentosos. Em fungos filamentosos, com ausência de propágulos, a identificação é realizada com sondas de DNA espécie-específicas ou por meio da caracterização de exoantígenos.

Muitas amostras oriundas de pacientes que estejam sob terapia antifúngica perdem a habilidade de esporulação; o subcultivo frequente pode, também, levar à ausência de esporulação, fenômeno denominado pleomorfismo. Em outros fungos, a ausência de esporulação em cultivos primários de isolamento é reversível quando são usados meios especiais de cultura, ágar batata dextrose e ágar fubá, para estimular a formação de propágulos.

O processo de formação dos propágulos (ontogênese) é tão importante quanto sua forma e seu tamanho. No entanto, na prática laboratorial o estudo da ontogênese não é realizado, restringindo-se a laboratórios de pesquisa e sistemática.

Na rotina laboratorial, os seguintes aspectos micromorfológicos devem ser observados para definir o gênero:

- Hifas hialinas ou demácias
- Hifas hialinas septadas ou sem septos aparentes – cenocíticas
- Forma e arranjo dos conídios
- Órgãos de reprodução assexuada e sexuada. Outras características associadas a essas, como temperatura máxima de crescimento, fontes de nutrição e produção de enzimas são critérios para diferenciar espécies e variedade, ou, mesmo, para classificar determinados gêneros com morfologias pouco peculiares.



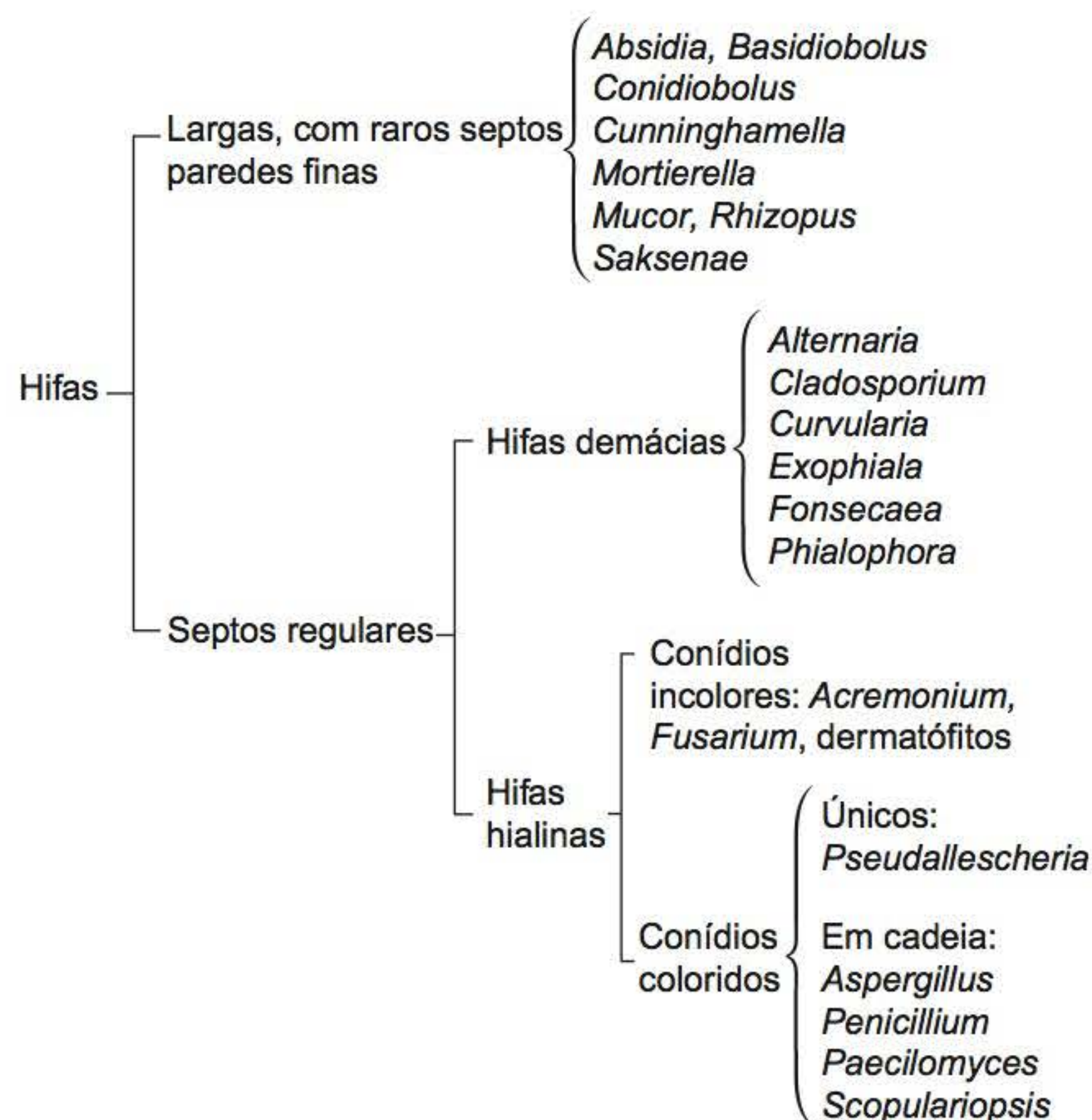
A análise conjunta das características microscópicas permite ao laboratorista clínico, em geral, classificar o gênero do fungo. Algumas exceções merecem destaque, tais como a identificação de fungos demácios, que necessita estudo especializado. A definição da espécie, na grande maioria dos casos, é tarefa de laboratórios de referência.

A análise microscópica de culturas de fungos é realizada com uma gota de corante lactofenol azul-algodão (fenol concentrado, 20 ml, ácido láctico, 20 ml, glicerol, 40 ml, azul algodão, 0,05 g, água destilada q.s.p., 20 ml) entre lâmina e lamínula. O fenol inviabiliza organismos vivos e o ácido láctico preserva as estruturas do fungo. O azul-algodão cora a quitina, presente nas paredes da célula fúngica. As mesmas estruturas podem ser visualizadas apenas com água ou solução salina, entretanto, o corante aumenta o contraste dos elementos fúngicos e permite a obtenção de preparações semipermanentes, se as bordas da lamínula forem seladas com esmalte.

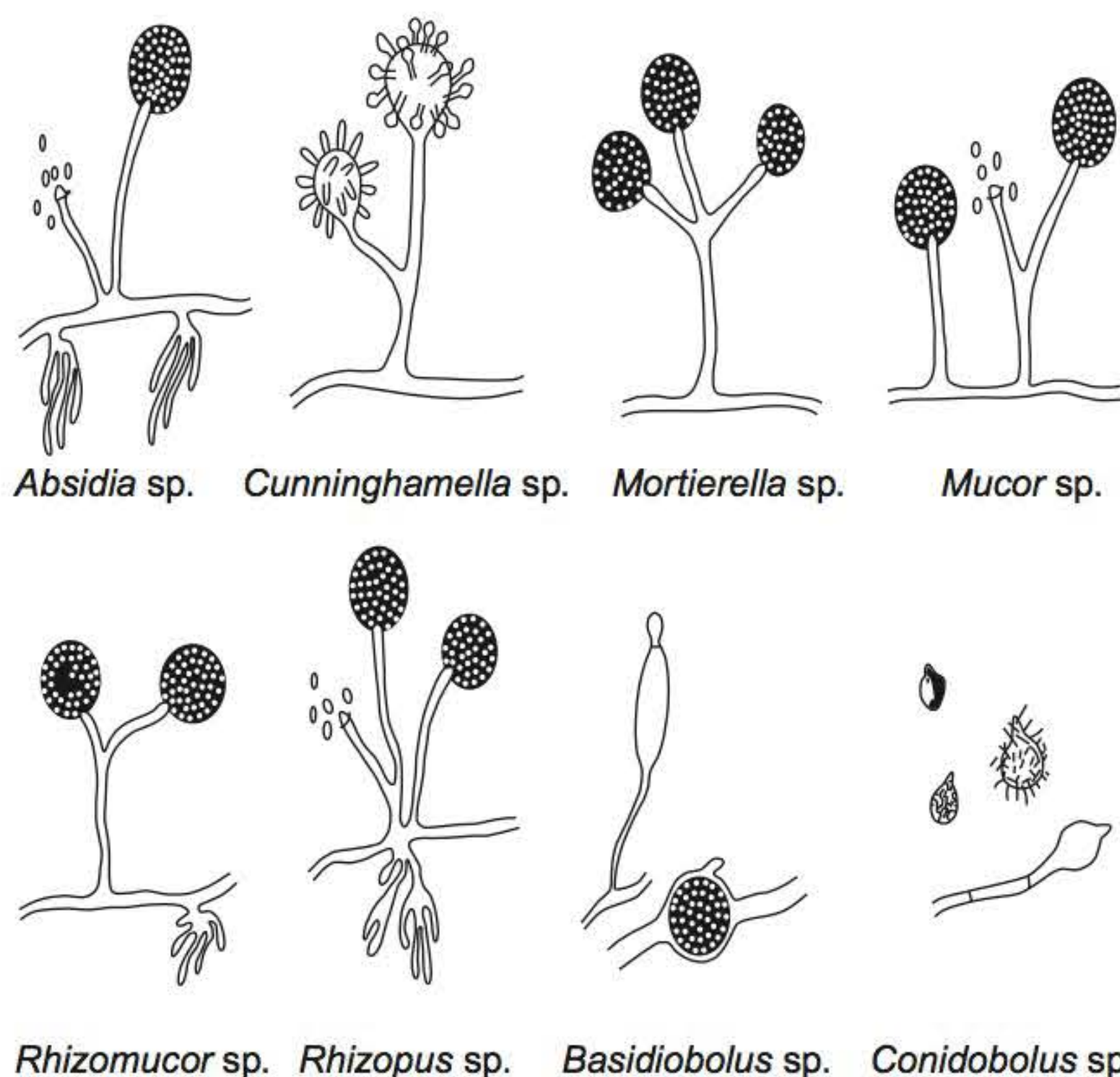
Na Figura 32.2 é apresentada uma chave simplificada de identificação dos principais fungos filamentosos de interesse médico. Alguns gêneros estão representados nas Figuras 32.3, 32.4 e 32.5. Para a identificação de fungos dimórficos pode-se utilizar a chave descrita na Figura 32.6.

### Testes para detecção de exoantígeno

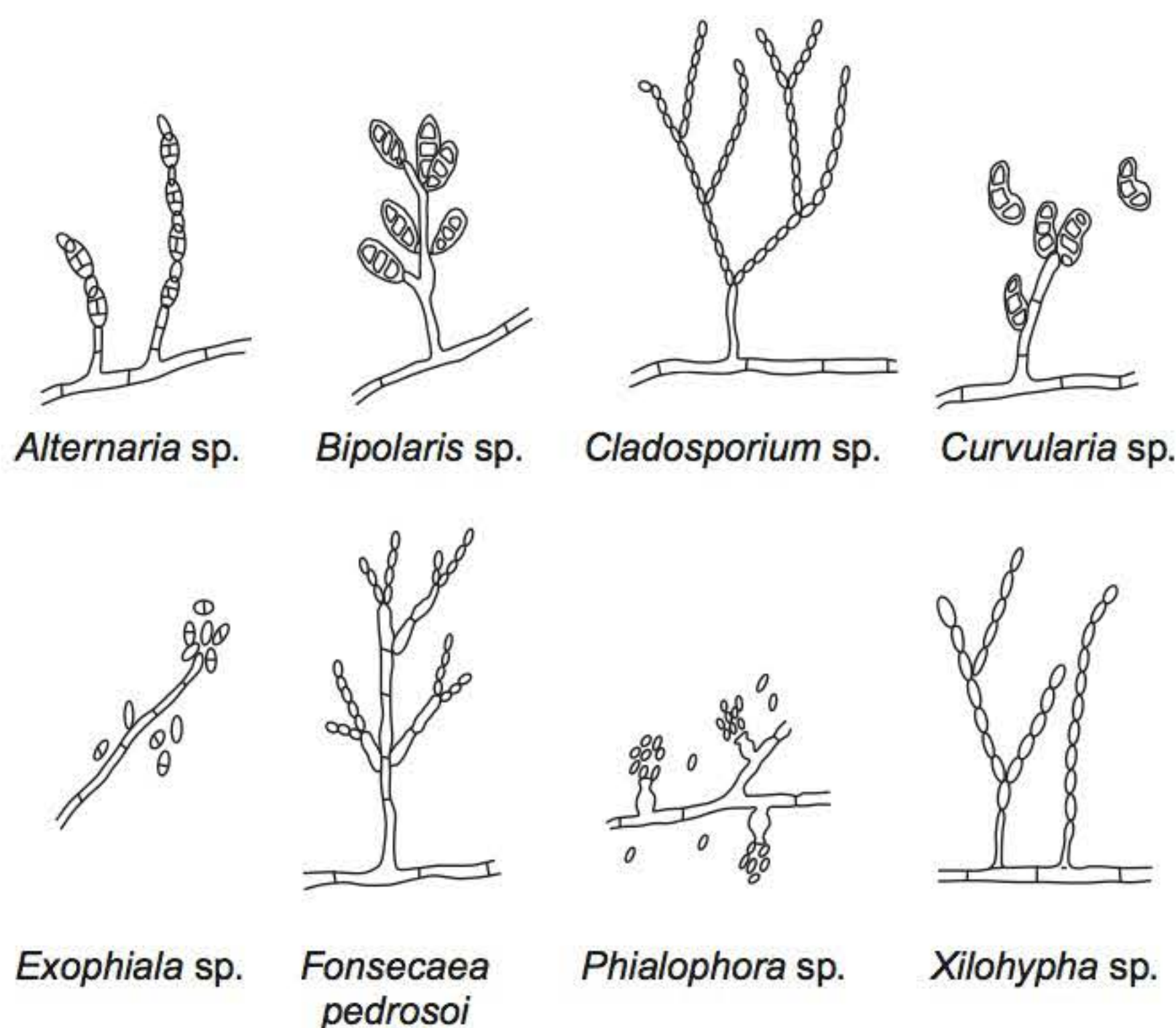
Isolados clínicos de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *C. immitis* e *B. dermatitidis* podem não esporular ou apresentar aspectos microscópicos atípicos, quando é difícil a conversão para fase leveduriforme. O teste para detecção de exoantígenos, realizado com reagentes disponíveis no mercado internacional, é útil na identificação de fungos que apresentam dificuldade na conversão. O extrato é obtido a partir da cultura em ágar Sabouraud-dextrose, concentrado 25 a 50 vezes e colocado em pequenos orifícios no gel de ágar sobre lâmina de imunodifusão. Colocam-se também antissoros específicos e antígenos padrão. Observa-se a formação de linhas de identidade entre os antígenos após 24 h à temperatura ambiente.



**Figura 32.2** Chave simplificada de identificação dos principais fungos filamentosos de interesse médico.



**Figura 32.3** Aspectos microscópicos de fungos com hifas largas e raros septos em cultura.



**Figura 32.4** Aspectos microscópicos de fungos com hifas septadas demácias em cultura.

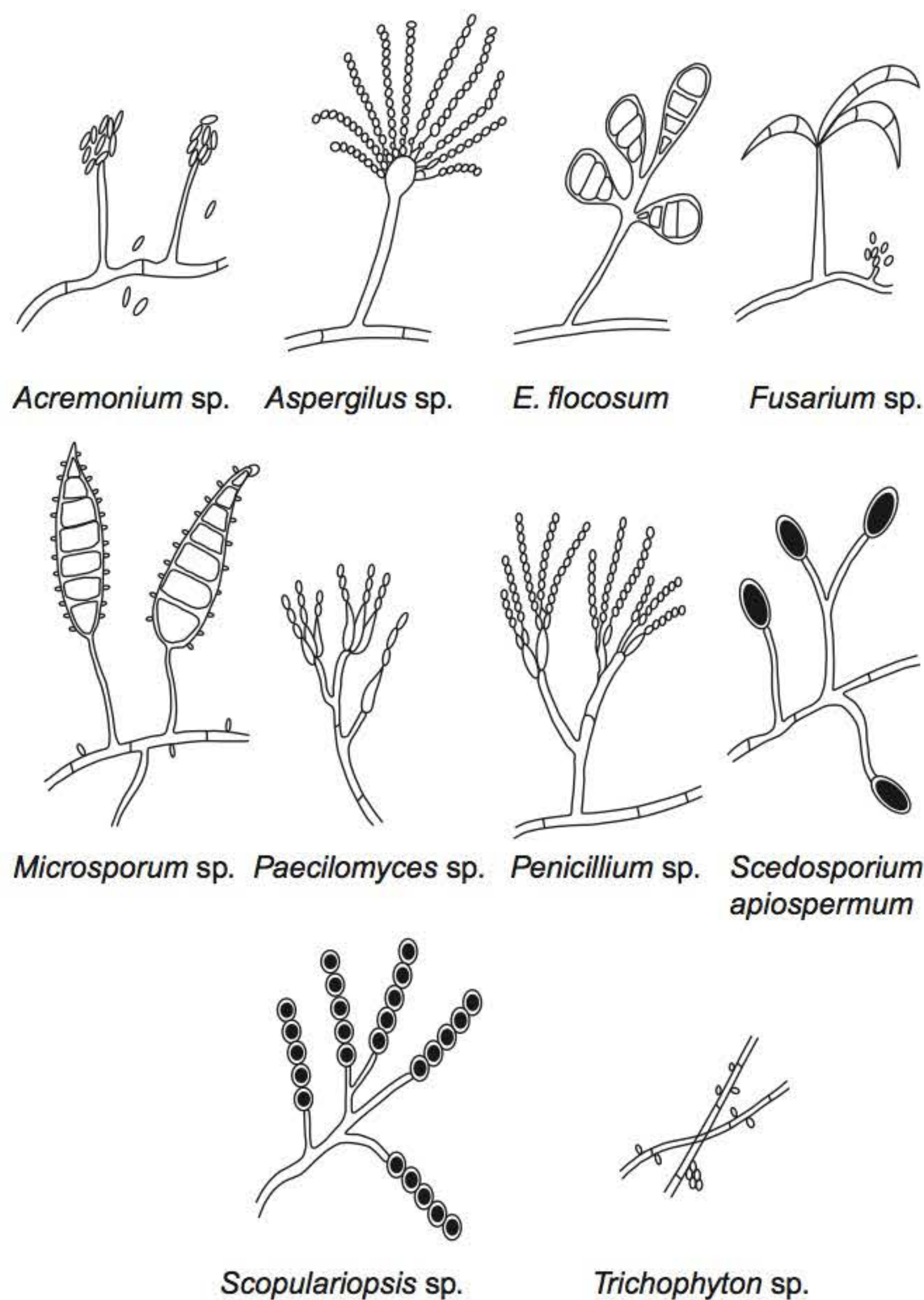
### Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos são pouco usados em laboratórios clínicos para identificar fungos filamentosos. Vale citar o teste da urease para diferenciar *Trichophyton mentagrophytes* de *T. rubrum* e o teste de hidrólise da gelatina para diferenciar espécies sapróbias e patogênicas de *Cladosporium*. Testes de hidrólise da tirosina, xantina e caseína são usados rotineiramente na identificação de actinomicetos aeróbios e como provas suplementares na identificação de certos agentes de feo-hifomicose (fungos demácios).

### Testes de hibridização de ácido nucleico

Todos os métodos descritos para fungos filamentosos são clássicos e podem ser bastante demorados, especialmente para





**Figura 32.5** Aspectos microscópicos de fungos com hifas septadas hialinas em cultura.

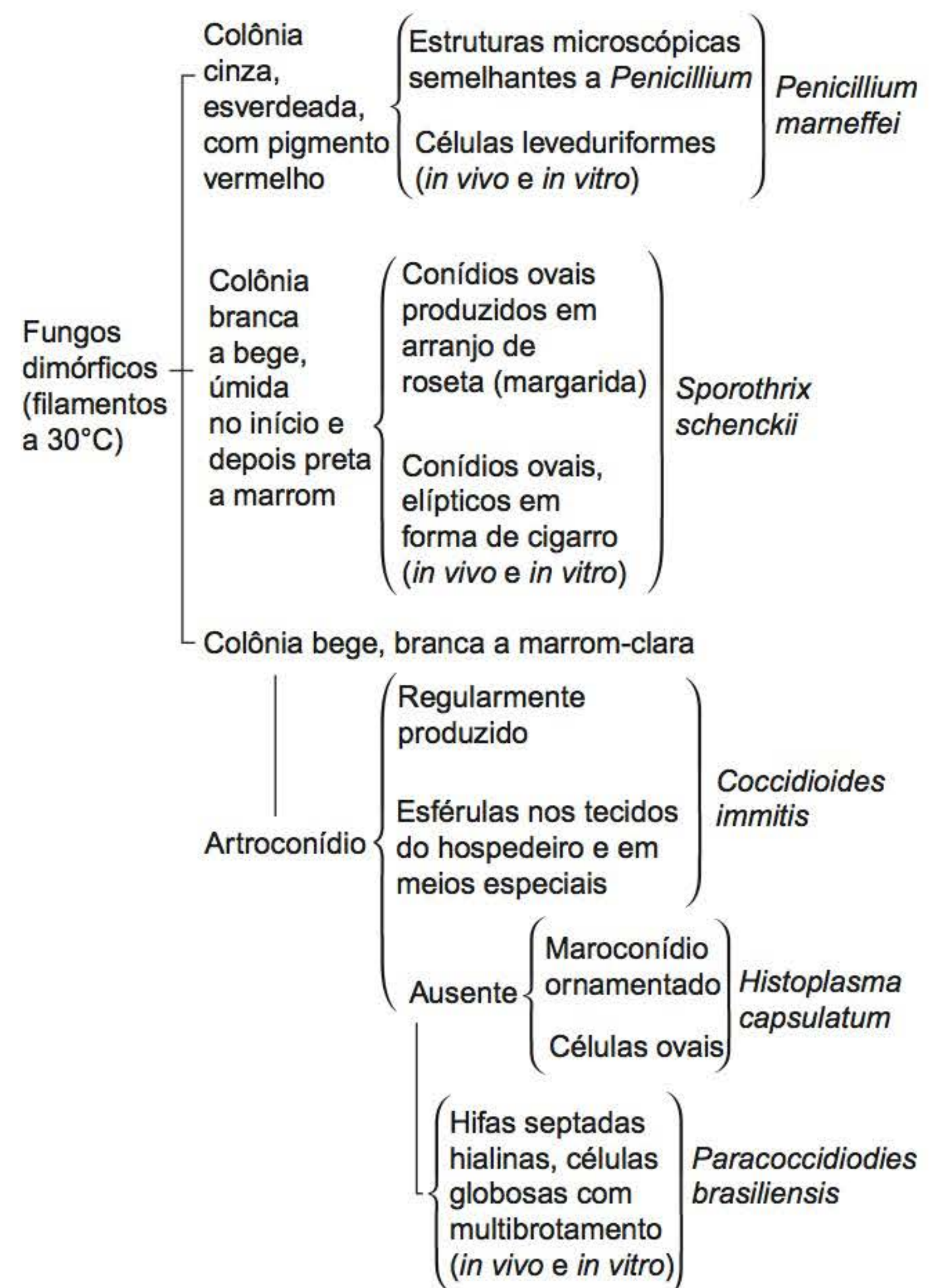
espécies de crescimento lento. As técnicas de biologia molecular tiveram desenvolvimento muito grande nos últimos anos, e atualmente estão disponíveis *kits* para a identificação de fungos. Os testes usam sondas de DNA espécie-específicas na hibridização do DNA ou RNA do organismo em identificação.

Técnicas de hibridização não isotópica DNA-RNA estão disponíveis comercialmente e empregam sonda de DNA-fita simples marcada com éster de acridina quimioluminescente, complementar ao RNA ribossômico do fungo. As vantagens deste método são sua alta sensibilidade e a possibilidade de identificação da colônia fúngica em fase inicial de desenvolvimento (menos de 1 cm de diâmetro). Sondas estão disponíveis para *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *C. neoformans*.

## Leveduras

Leveduras são ubiqüitárias em nosso meio e podem ser isoladas de frutas, vegetais e plantas em geral. Algumas fazem parte da flora da superfície da pele, mucosa bucal, vaginal e trato intestinal de homens e animais, podendo ser isoladas de espécimes clínicos e não ter qualquer significado patológico. Leveduras são consideradas patógenos oportunistas e podem causar doença em pacientes debilitados ou com fatores predisponentes para essas infecções.

Leveduras isoladas de determinados espécimes, como hemoculturas, LCR, de tecidos biopsiados e outros líquidos biológicos, normalmente estéreis, bem como isoladas repe-



**Figura 32.6** Chave simplificada de identificação de fungos dimórficos.

tidamente de pacientes imunocomprometidos, de variados espécimes clínicos são significantes e devem ser acuradamente identificadas.

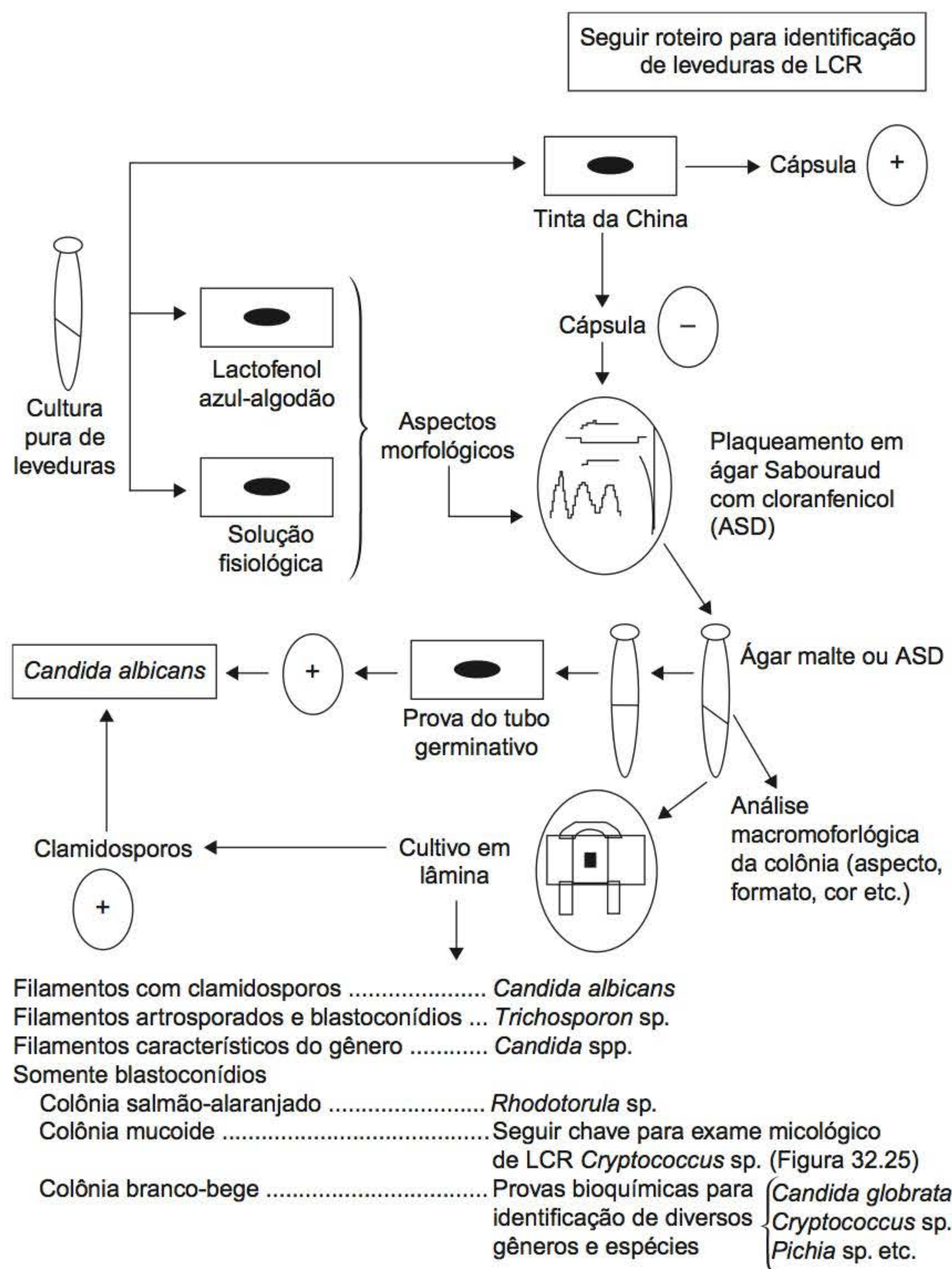
Na identificação de leveduras, vários tipos de testes são usados. Estes incluem aspectos morfológicos macro e microscópicos, prova do tubo germinativo, filamentação em ágar fubá-tween 80, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, presença de certas enzimas, como urease e fenol oxidase e formação de ascósporos. A Figura 32.7 apresenta os procedimentos práticos para a identificação das principais leveduras de interesse médico.

## Aspectos da morfologia da colônia

A maioria das leveduras cresce adequadamente a 30°C ou à temperatura ambiente em ágar Sabouraud dextrose ágar, com exceção de *Malassezia furfur*. A colônia suspeitada deve ser reisolada em meio adequado até a obtenção de uma colônia pura. Em 2 ou 3 dias formam-se colônias de cor branca a creme, amarela, alaranjada ou vermelha, de textura pastosa, mucoides ou secas, lisas ou enrugadas. Dependendo das condições de cultivo e nutricionais, franjas filamentosas podem desenvolver-se ao redor da margem da colônia em algumas espécies.

Características como cor, consistência, bordos, superfície e topografia são observadas em meio sólido. A formação de película em meios como caldo Sabouraud ou extrato de malte é vista com certa cautela devido à sua variabilidade; pode ser útil na identificação de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *Trichosporon* sp.





**Figura 32.7** Procedimentos práticos para a identificação das principais leveduras de interesse médico.

A habilidade da levedura de crescer a 37°C é uma característica importante; a maioria das leveduras patogênicas cresce bem a 25 e 37°C, enquanto as sapróbias não crescem em temperaturas mais elevadas.

De acordo com o tipo de esporo formado, as leveduras são caracterizadas como:

- **Leveduras ascosporadas:** reprodução sexuada por meio de ascas e ascorpos (divisão Ascomycota)
- **Leveduras com basidiosporos:** reprodução sexuada, formando teliosporos, basídios e basidiosporos (divisão Basidiomycota)
- **Leveduras de reprodução assexuada:** reprodução assexuada por meio de brotamento, fissão, brotamento-fissão e balistoconídios (divisão Deuteromycota).

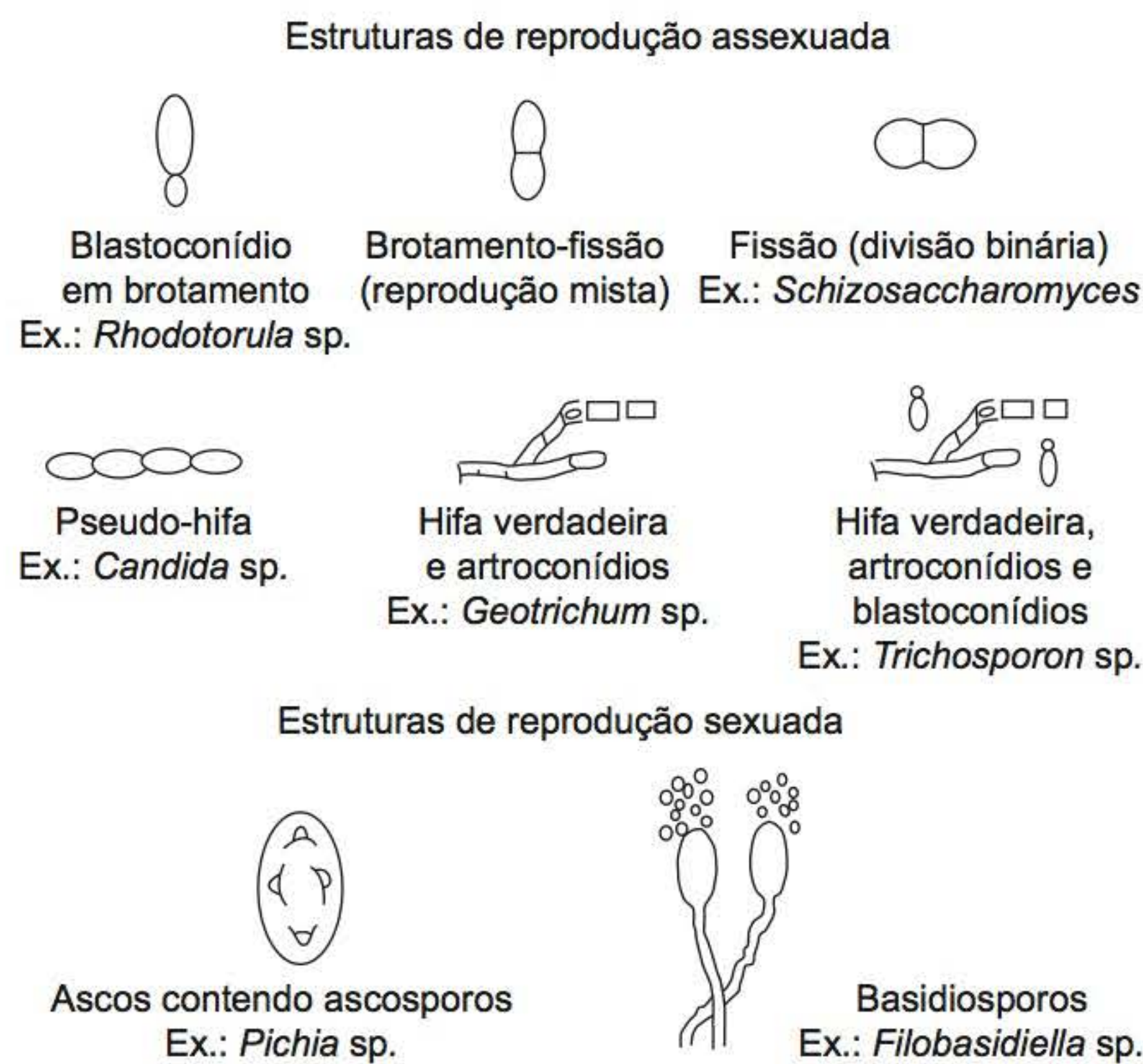
### Morfologia microscópica

As estruturas de reprodução assexuada e sexuada são empregadas na identificação genérica de leveduras. Ao exame da cultura, realizado com salina ou corante lactofenol azul-algodão, devem-se observar as células sob processo de multiplicação por brotamento, fissão ou brotamento-fissão (misto)

(Figura 32.8). Blastocónídios podem ser redondos, ovais ou alongados. Podem ter brotos únicos ou múltiplos, de forma bipolar ou irregular. A formação de pseudo-hifas, pela junção de blastocónídios ou hifa verdadeira, a partir de germinação de blastocónídio, pode ser visualizada. Artroconídios, ascas e ascósporos ou outras estruturas podem ser observados. Cápsulas podem ser vistas ao redor de células arredondadas em preparações com tinta da China. A presença de cápsula não indica, necessariamente, *C. neoformans*, pois outras espécies de *Cryptococcus* e outras leveduras, tais como *Rhodotorula* sp. e *Candida* spp. (ex-*Torulopsis* sp.), produzem cápsula. Porém, na prática, células capsuladas redondas, de colônias não pigmentadas, especialmente aquelas isoladas de LCR, devem ser consideradas *C. neoformans* até a sua identificação completa e, portanto, deve ser processado o segundo fluxograma apresentado no item criptococose. Cultivos em lâmina, nesses casos, são desaconselháveis, porque oferecem maior biorrisco para o laboratorista do que leveduras pertencentes a outros gêneros de menor virulência.

A capacidade de filamentação em leveduras, seja por pseudo-hifas, seja por hifas verdadeiras (Figura 32.1), bem como a





**Figura 32.8** Morfologia microscópica de estruturas assexuadas e sexuadas de leveduras de interesse médico.

habilidade de formar clamidósporos ou, ainda, artroconídios, é avaliada à temperatura ambiente, durante 3 dias, em ágar fubá (fubá, 40 g, ágar, 20 g, polissorbato 80 ou tween 80, 10 mL, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 6,6 a 6,8) com tween 80. A sementeira, em forma de duas linhas paralelas, deve ser feita diretamente sobre o ágar derramado sobre lâmina de microscopia. O cultivo em lâmina é, então, recoberto por lamínula e colocado em câmara úmida, em condições de assepsia. A observação do cultivo, levado diretamente ao microscópio, permite, em conjunto com as características macroscópicas da cultura, a orientação para um ou mais gêneros de leveduras. Outras provas são, então, necessárias para confirmar o gênero e, também, a identificação da espécie. A única exceção em que se tem a identificação de gênero e espécie pelo cultivo em lâmina é, justamente, *Candida albicans*, a levedura mais frequentemente relacionada com a espécie humana. A observação de hifas verdadeiras e clamidósporos típicos, redondos e terminais, além dos intercalares, são peculiares de *C. albicans*.

Em 1995 foi descrita a espécie *C. dubliniensis*, cujas características fenotípicas são semelhantes às de *C. albicans*, incluindo formação de tubo germinativo e clamidósporos. Para diferenciá-las são necessárias provas como resistência a altas temperaturas e crescimento em substratos especiais, bem como métodos moleculares.

A prova de tubo germinativo, realizada com uma porção da cultura e soro normal, é convencional em micologia médica para identificar *C. albicans*, pois apresenta a vantagem de ser rápida (2 a 3 h); porém, a sua baixa especificidade (resultados falso-positivos) e a alta interferência de variáveis referentes aos nutrientes e contaminação bacteriana restringem muito o uso do teste. Outras leveduras podem formar tubo germinativo, especialmente *C. tropicalis*, e a estrutura pode ser confundida com pseudo-hifa em formação. O tubo germinativo não forma constrição no ponto de ligação com a célula-filha, ao contrário da pseudo-hifa. Além disso, nem todos os isolados de *C. albicans* formam tubo germinativo, em particular as cepas provenientes de pacientes com câncer submetidos a terapia. Assim, esse teste deve ser combinado a outros procedimentos, como a pesquisa de clamidósporos, para a identificação definitiva de *C. albicans*.

As formas teleomorfas, ou sexuadas, expressas pela formação de ascos contendo ascósporos ou basídios com basidiosporos, não são ainda conhecidas para a maioria das leveduras patogênicas. A forma sexuada de *C. neoformans* (*Filobasidiella neoformans*) só é obtida e estudada em laboratórios de pesquisa. Os isolados dessa levedura são sempre haploides e há necessidade de realizar cruzamentos *in vitro* em meio especial para a obtenção da forma sexuada. Em laboratório clínico não há necessidade de se obter essa forma para identificar a levedura. Por outro lado, algumas leveduras isoladas em laboratórios a partir de espécimes clínicos formam ascósporos. Espécies dos gêneros *Pichia* e *Saccharomyces*, entre outros agentes emergentes, merecem atenção em laboratórios clínicos devido às infecções que podem causar, em particular, de origem nosocomial. Diante da suspeita de levedura ascosporada, deve-se proporcionar condições para que haja aumento ou indução da estrutura de origem sexual, usando-se meios de ágar acetato, ágar extrato de malte (extrato de malte, 30 g, ágar, 15 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 5,5) ou ágar V-8 (vegetais). Preparações de porções da cultura, após 2 a 5 dias, com salina ou colorações de Wirtz ou Ziehl-Neelsen, permitem observar ascos ou somente ascósporos liberados (Figura 32.8). No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciam-se 1 a 4 esporos globosos e em *Pichia anomala*, 1 a 4 esporos em forma de elmo (chapéu).

## Testes fisiológicos

### Assimilação e fermentação

Para a execução dos testes fisiológicos para confirmação de gênero e identificação de espécie, deve-se assegurar a pureza da colônia analisando-se esfregaço corado segundo Gram ou apenas com solução salina. Os testes incluem métodos de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de carboidratos.

Os testes de assimilação indicam a habilidade do organismo de usar determinado composto na presença de oxigênio; cada espécie tem o seu próprio padrão de assimilação que é utilizado para sua identificação. As provas são desenvolvidas, tradicionalmente, segundo método de Wickerham em meio líquido de cultura. Mas a maioria dos laboratórios clínicos e de pesquisa, utiliza o sistema de Beijerinck adaptado para placa de Petri (sulfato de magnésio hepta hidratado, 0,5 g, fosfato de potássio monobásico, 1 g, ágar, 20 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; adicionar dextrose, 20 g, ou sulfato de amônio, 5 g, conforme a prova; pH final, 7,0 a 7,2), ou mesmo, sistemas rápidos disponíveis no mercado. O poder discriminatório dos testes de assimilação (auxanograma) é grande e é potencializado quando provas de fermentação (zimograma) são associadas. A prova de assimilação de nitrato é usada frequentemente como triagem, em especial para espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*.

A fermentação avalia a capacidade do organismo de usar determinado composto anaerobiamente. Esse teste envolve a inoculação de vários tubos contendo o meio basal (extrato de carne, 3 g, peptona, 10 g, NaCl, 5 g, carboidrato, 20 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 7,2) e um carboidrato a ser avaliado. Depois de 5 ou mais dias de incubação, os tubos são observados quanto à produção de gás. Nos itens Candidíase e Criptococose são apresentados os resultados de auxanograma e zimograma para as diversas espécies desses gêneros. A literatura especializada citada na Bibliografia deste capítulo traz tabelas com protocolos de todas as espécies conhecidas.



### Teste da urease

Este teste é importante para a identificação de leveduras do grupo dos basidiomicetos, ou seja, para as quais já foi descrita a reprodução sexuada por basídios. Entre elas, as espécies de *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* produzem a enzima urease, assim como algumas espécies do gênero *Candida*. Porém, a maioria das leveduras de importância médica são urease-negativas. Dois tipos de testes podem ser usados: alcalinização de ágar-ureia de Christensen (peptona, 1 g, glicose, 1 g, NaCl, 5 g, fosfato de potássio monobásico, 2 g, vermelho de fenol, 12 mg, ureia, 20 g, ágar, 20 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 6,8) e teste rápido de urease.

### Teste de fenol-oxidase

A formação desta enzima é muito útil como teste presuntivo de *Cryptococcus* sp. Vários meios têm sido usados para demonstrar a presença desta enzima. O primeiro a ser usado foi ágar *Guizotia abyssinica*, à base de niger, uma semente usada na alimentação de pássaros. O extrato desta semente contém ácido cafeico, que serve como substrato para a enzima fenol-oxidase. *C. neoformans* produz fenol-oxidase que, ligada à membrana, catalisa a oxidação de vários compostos difenólicos, tais como L-dopa, L-dopamina, ácido clorogênico e ácido cafeico. As leveduras, quando crescem em meios com esses compostos, produzem, em 2 a 5 dias, colônias pretas ou marrons, dependendo do substrato.

### Teste de azul de diazônio B (DBB)

Este teste é usado para identificar basidiomicetos. As leveduras desse grupo produzem reação positiva quando expostas ao corante, enquanto as relacionadas com ascomycetos são negativas à coloração.

### Outros testes

Na classificação de leveduras outros testes podem ser usados, entre eles: produção de amido extracelular, crescimento a 37°C, crescimento em meio isento de vitaminas, crescimento em altas temperaturas, produção de amônia, produção vigorosa de ácido, tolerância a 10% de ácido acético, hidrólise da arbutina, redução do TTC (cloreto de trifetil tetrazólio) e sensibilidade à cicloeximida.

### Sistemas comerciais para a identificação de leveduras

As infecções por leveduras, em particular as formas invasivas, requerem diagnóstico rápido e prático a fim de permitir a correta orientação terapêutica. Os métodos convencionais têm como base algumas propriedades fenotípicas das leveduras que incluem morfologia e microscopia das colônias em ágar fubá-tween 80, produção de tubo germinativo, crescimento em meios especiais, tal como ágar contendo compostos fenólicos, além de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de açúcares. As provas realizadas sob metodologias de referência requerem longos períodos de preparo, padronização e controle de qualidade dos reagentes, além de procedimentos muito laboriosos para serem praticados em laboratórios de rotina. A necessidade de identificação rápida de leveduras e disponibilidade de cultura pura para a execução de testes de suscetibilidade a antifúngicos, somando-se à grande dificuldade em detectar culturas mistas em meios tradicionais como ágar Sabouraud, induziram o desenvolvimento industrial de sistemas comerciais para esses propósitos.

### Meios cromogênicos

Os meios de cultura que contêm substâncias cromogênicas que, sob ação enzimática dos isolados, conferem cores às colônias são, hoje, obrigatórios nos procedimentos de micologia em laboratórios de rotina.

O desempenho dos meios cromogênicos parece ser similar tanto para isolados primários quanto para culturas mantidas no laboratório. Dada a variedade de cores observadas em alguns meios cromogênicos, os maiores méritos deles são: (a) identificação presuntiva de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e (b) possibilidade de indicar a presença de cultura mista quando ela é composta das principais espécies de interesse médico. Culturas mistas, com duas ou mais espécies de leveduras, ou contaminadas com bactérias, constituem a maior causa dos erros de identificação e, por esse motivo, deve sempre ser garantido o trabalho com cultura pura. Um importante ponto crítico dos sistemas comerciais é a padronização do inóculo que, se for muito denso, pode mascarar a presença de cultura mista ou contaminada com bactérias. Os meios cromogênicos contêm, em regra, substâncias antibióticas em sua composição, mas, ainda assim, permitem o desenvolvimento de bactérias que se apresentam como pontos escuros sobre ou ao lado das colônias de leveduras.

É recomendável utilizar uma suspensão da levedura em turbidez equivalente à do tubo 0,5 da escala de Mac Farland, para realizar o plaqueamento de uma alçada sobre a superfície do meio cromogênico antes de incubar, conforme instrução do fabricante.

Note-se que nenhum meio cromogênico é capaz de identificar algumas espécies de alta importância em infecções invasivas, como *Candida parapsilosis* e, por isso, o usuário desses meios deve estar preparado para interpretar corretamente seus resultados.

Um ponto importante é que alguns sistemas apresentam reações colorimétricas incompletas, o que confere coloração incerta à suspensão e ocasiona erros de leitura. Outra questão relevante se refere ao tempo de aparecimento da cor nas colônias, que varia conforme a temperatura e o tamanho de inóculo empregado, devendo, portanto, o laboratorista realizar sempre o controle de qualidade de cada lote de meio preparado para a avaliação desse parâmetro. Muitos estudos comprovam que a maior especificidade da reação colorimétrica, que atinge 100% em alguns meios, ocorre somente às 48 h de incubação a 37°C. Muitas vezes, a pressão para emissão rápida de um resultado presuntivo de identificação da cultura leva o laboratorista a erros que não ocorreriam se a leitura fosse realizada às 48 h de incubação dos meios cromogênicos.

Na rotina laboratorial, o uso de meios cromogênicos permite a detecção da presença, ou não, de *Candida albicans*. Isso tem grande importância porque outras espécies podem apresentar resistência a um ou a vários antifúngicos. Vale enfatizar que os laboratórios que usam sistemas comerciais devem se submeter, periodicamente, a um programa externo de qualidade, além de implementar seus próprios procedimentos de controle interno.

### Características dos meios cromogênicos

Atualmente existem muitos meios cromogênicos no mercado internacional para identificação de *Candida* spp. Os mais utilizados são: Candiselect® (Bio-Rad, França), Candida ID® (bio-Mérieux, França), CHROMagar Candida® (Becton Dickinson, EUA), Chromogenic Agar Candida® (Oxoid, Inglaterra) e Hichrom Candida Agar® (HiMedia, Índia).



O Candiselect® permite a identificação presuntiva de *C. albicans*/*C. dubliniensis* (colônias cor-de-rosa/púrpura) e sua discriminação de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (colônias cor azul-turquesa, sendo a última cercada de halo de cor branca). De outro modo, Candida ID® confere cor azul às colônias de *C. albicans*/*C. dubliniensis*. Apesar de colônias de *Trichosporon* spp. apresentarem a mesma cor azul nesse meio, esse gênero é facilmente diferenciado pela morfologia rugosa de sua cultura. A mais nova versão desse meio (Candida ID2®) propõe-se a distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis*, mas a falta de dados não permite essa comprovação. A grande vantagem observada no uso de Candida ID2® é a formação de cor nas primeiras 24 a 30 h, em relação aos outros meios. O meio CHROMagar Candida® permite diferenciar, de modo presuntivo, colônias de *C. albicans* (colônias de cor verde), *C. tropicalis* (colônias de cor azul), *C. krusei* (colônias cor-de-rosa e de aspecto seco), *C. glabrata* (colônias cor-de-rosa e aspecto seco e úmido, respectivamente). No entanto, fatores como a experiência do laboratorista e o tempo de isolamento da cultura influem sobremaneira nesses resultados. Além disso, deve-se notar que isolados de *C. lusitanae* também produzem colônias azuis e *Trichosporon* spp. apresenta colônias azuis-esverdeadas nesse meio. As colônias brilhantes de *Cryptococcus neoformans* adquirem cor bege-claro e outras espécies de *Candida* assumem cores únicas ou múltiplas, que variam de branco a bege, rosa, lilás e violeta. O Chromogenic Agar Candida® induz a formação de várias cores, de acordo com a espécie da levedura. *Candida albicans* produz colônias verdes e *C. dubliniensis* pode ter coloração verde com tons azuis, diferentemente de *C. tropicalis* (cor azul-escura), *C. krusei* (cor-de-rosa com aspecto seco), *C. guilliermondii*/*C. pelliculosa* (cor-de-rosa com tons violeta), e *Cryptococcus neoformans*, *C. glabrata* e outras espécies de *Candida* (bege a marrom-claro). *Trichosporon* spp. produz coloração verde-azulada nesse meio, mas, como ocorre no CHROMagar, sua morfologia é muito característica, o que o distingue de *Candida* spp. Estudos mostram que Hichrom Candida Agar® apresenta resultados variados em relação à sua capacidade de indicar seletivamente a presença de *Candida albicans* (verde) e outras espécies de *Candida*. *Candida tropicalis* apresenta tonalidade azul, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* têm colônias cor-de-rosa, porém essas tonalidades não são intensas. Apresenta a vantagem, em relação a outros meios cromogênicos, de conferir às colônias de *Trichosporon* spp. cor azul-escura distinta de *C. albicans*.

### Sistemas comerciais

O desenvolvimento de sistemas rápidos tem como principais objetivos: (a) identificar, de modo presuntivo, espécies de agentes etiológicos mais importantes, tanto pela maior morbidade (*i. e.*, *Candida albicans*) quanto pelo alto potencial de resistência ao antifúngico mais amplamente usado nas candidíases invasivas, o fluconazol (*i. e.*, *C. krusei* e *C. glabrata*) e (b) identificar um grande número de espécies de interesse médico.

Dentro do primeiro objetivo, alguns produtos foram desenvolvidos para a identificação de *Candida albicans*, como: *C. albicans* Test Kit® (Remel, EUA), BactiCard Candida® (Remel, EUA), RID Zyme CAS Test® (Mitsubish Kagaku Iatron, Japão) e O.B.I.S. albicans® (Oxoid, Inglaterra). Sistemas denominados Albistrip® (Lab.M, Inglaterra) e Albicans-Sure® (Clinical Standards Laboratories, EUA), aparentemente, foram descon-

tinuados. Todos esses sistemas permitem a emissão de resultados imediatos, em períodos que variam entre 5 min e 60 min, com excelente sensibilidade (> 98%) e alta especificidade (> 93%). Convém ressaltar que nenhum desses sistemas consegue distinguir *C. dubliniensis* de *C. albicans*.

Outros sistemas existem para detectar a presença de *C. glabrata*, dentre eles: Remel Assimilation® (Remel, EUA), Remel Modified Fermentation® (Remel, EUA), Hardy Fermentation® (Hardy Diagnostic, EUA), Rosco Trehalose-Sacarose® (Rosco Diagnostica, Dinamarca) e Glabrata RTT® (Fumouze Diagnostics, França). Os resultados desses sistemas rápidos são obtidos de 15 min a 24 h, conforme o método, e todos garantem boa sensibilidade e especificidade, com taxas acima de 90%.

Dentre os sistemas destinados a identificar grande número de espécies, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* e outras de interesse médico, vale citar: API 20C® (bioMérieux, França), Fungichrom® (International Microbio, Fr), Fungifast® (Internatioanl Microbio, França); RapID Yeast Plus System® (Remel, EUA), Auxacolor® (Bio-Rad, EUA), ID 32C® (BioMérieux, França), Vitek® (BioMérieux, França) e MicroScan Yeast Identification Panel® (Dade Behring, EUA). Mais recentemente, foi desenvolvido o meio CHROM-Pal (CH-P). Este meio consiste na mistura do meio CHROMagar Candida® com ágar Pal, que foi originalmente desenvolvido para a identificação de *Cryptococcus neoformans* e tem sido utilizado para a diferenciação entre *C. dubliniensis* e *C. albicans*. Neste meio, *C. dubliniensis* forma colônias rugosas e clamidósporos, enquanto *C. albicans* mostra colônias lisas e não produz clamidósporos.

### Sistemas automatizados

#### ID 32C®

O sistema é composto por microplacas que contêm 24 carboidratos, cinco ácidos orgânicos, cicloeximida e esculina. A incubação do teste é feita a 30°C e a leitura pode ser manual ou automatizada, entre 24 e 48 h; porém, um estudo mostrou melhor desempenho do sistema com leitura de 72 h. Resultados corretos são obtidos em 89 a 98% dos testes, e por isso é o método mais empregado em estudos europeus.

#### Vitek®

Trata-se de um sistema amplamente utilizado em laboratórios com grande volume de amostras e tem desempenho adequado para esse ambiente. O sistema Vitek Yeast Biochemical Card® (YBC) compreende cartão para testes com 21 carboidratos, nitrato de potássio, ácido orgânico, urease e cicloeximida. O cartão é incubado a 30°C por 24 h a 48 h e lido automaticamente por reação colorimétrica. Em relação aos métodos convencionais ou API 20C, a correlação de resultados situa-se entre 85 e 98%. O sistema Vitek 2 YST® emprega testes com 25 carboidratos, nitrato de potássio, 9 ácidos orgânicos, esculina e substratos para urease, aminopeptidase e glicosidase. Após incubação a 35°C por 18 h, a leitura automatizada é realizada por método colorimétrico. Quando comparado com o sistema API 20 C, os resultados são concordantes em 95%. Um estudo multicêntrico mostrou correlação em 98,5% dos testes. Deve-se observar, no entanto, que o uso prévio e recomendável de meios cromogênicos para o isolamento primário do agente etiológico pode influenciar os resultados de identificação posterior pelo Vitek®. Estudos demonstraram que, quando colônias isoladas em CHROMagar Candida® foram submetidas ao novo método colorimétrico Vitek 2 YST Card®, a proporção de resultados com baixa discriminação



aumentou, especialmente, para espécies como *C. dubliniensis* e *Rhodotorula glutinis*. O desempenho do novo sistema Vitek para a determinação de cepas de *Candida* spp. resistentes a antifúngicos ainda está sob avaliação. Alguns estudos indicam que, apesar de os valores de MIC (concentração inibitória mínima) não terem concordância alta com a metodologia de referência de microdiluição, o sistema tem bom desempenho para classificar os isolados dentro das três categorias de sensibilidade (sensível, intermediária; suscetibilidade dependente da dose e resistente) segundo *breakpoints* propostos. Assim, a concordância de MIC foi de 34% para anfotericina B, 96,3% para 5-fluoritosina, 87,8% para fluconazol e 95,3 para voriconazol, enquanto a categorização correta foi de 98,5 para anfotericina B, 95,3% para 5-fluoritosina, 85,4% para fluconazol e 97,6% para voriconazol.

#### MicroScan Yeast Identification Panel®

Composto de cartões contendo 13 aminopeptídeos, três carboidratos, testes enzimáticos para glicosidase, fosfatase e urease, após incubação por apenas 4 h sob temperatura de 37°C e adição de reagente revelador de reação, a leitura manual ou automatizada pode ser realizada. Resultados idênticos aos obtidos com API 20C AUX foram obtidos em 86 a 97% dos testes.

#### Sistemas exclusivos para a identificação de *Candida albicans*

*Candida albicans* é a espécie de maior prevalência em materiais biológicos e, portanto, métodos para sua identificação rápida são de extrema utilidade em laboratórios clínicos. Descrevemos, a seguir, alguns sistemas que visam à identificação desta levedura, como alternativas para as provas tradicionais de clamidósporo e tubo germinativo:

- Albicans-Sure (Clinical Standards Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, EUA): contém um cartão com dois substratos para as enzimas  $\beta$ -galactosaminidase e L-prolina aminopeptidase. A leitura da reação entre a suspensão da levedura e os substratos, após 5 min, é feita com a ajuda de substâncias reveladoras. Reações positivas com os dois substratos indicam tratar-se de *C. albicans*. A sensibilidade do teste é de 99%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e negativo de 98,9%
- Bacti-Card-*Candida* (Remel, Lenexa, Kansas, EUA): é similar ao Albicans-Sure, sendo distinto apenas nas substâncias reveladoras. A sensibilidade também é alta (99,3%) e a especificidade, de 99,6%. Os valores preditivos, positivo e negativo, são respectivamente de 99,6 e 99,3%
- Murex *Candida albicans* CA50 (Murex Diagnostic Inc., EUA): baseia-se também na detecção em 30 min, por reação colorimétrica, das enzimas  $\beta$ -galactosaminidase e L-prolina aminopeptidase. O teste apresenta sensibilidade de 95 a 98,7%, especificidade entre 97,8 e 99,6%, valor preditivo positivo de 99,6% e negativo de 98,6%. A leitura pode ser subjetiva se a cor amarela, resultante da reação positiva, se apresentar em tonalidades claras
- Bichro-latex albicans (Fumouze, França): identifica, por reação enzimática, em 5 min, culturas de *C. albicans* com especificidade de 99,8% e sensibilidade de 99,7%. É fácil de ser aplicado e os resultados positivos são claramente identificáveis. Devido à coloração das pérolas utilizadas na prova, não há necessidade de verificação de autoaglutinação, fator de interferência na maioria dos ensaios de aglutinação. Como todos os outros testes, o isolamento primário das colônias da levedura em meios usuais de cultura é necessário, o que demora de 24 a 48 h, mas a vantagem do Bichro-latex albicans é que pode ser realizado diretamente sobre as colônias do isolamento primário, não requerendo repiques subsequentes
- MIS (Microbial ID Inc., Dinamarca): sistema computadorizado que analisa por cromatografia os ácidos graxos, comparando-os a perfis predeterminados existentes em sua base de dados. O sistema foi desenhado para identificar bactérias, mas apresenta a opção de identificar leveduras. Requer uma fase prévia de preparação química das amostras. Resultados corretos são obtidos em 71 a 75% das amostras e inconclusivos em 6 a 16% do total de leveduras. A sensibilidade para *C. glabrata* é de 82%, mas o valor preditivo alcança 100% para essa espécie. Em contraste, o valor preditivo para *S. cerevisiae* é de 46%, pois inclui *C. glabrata*, de modo incorreto, nesta espécie. No entanto, todas as amostras de *S. cerevisiae* são identificadas acertadamente. A acurácia para muitas outras espécies é inaceitavelmente baixa, havendo, portanto, necessidade de melhoria na base de dados ou nos procedimentos empregados neste sistema, para a indicação de seu uso em laboratórios clínicos.

#### Meios diferenciais para leveduras

O ágar Sabouraud não tem propriedade seletiva ou diferencial e, portanto, não proporciona o reconhecimento adequado (sensibilidade de 65,5%) de culturas mistas de leveduras. Os meios diferenciais para a identificação macroscópica presumida de espécies do gênero *Candida* se baseiam na formação de coloração distinta de diferentes espécies ante certos substratos. Meios diferenciais clássicos, tais como Nickerson, Biggy, Pagano-Levine, TTC (*triphenyl tetrazolium chloride*) e fosfomolibdato são amplamente utilizados devido à facilidade de execução. Porém, resultados falso-positivos e negativos levam à busca de meios diferenciais com maior especificidade. Meios que permitem a detecção de metabólitos fluorescentes, tais como “Fluoroplate” ágar (Merck, Alemanha) e “Aniline Blue Dye Medium”, apresentam boa sensibilidade (93,8%) e especificidade (98,6%), mas requerem um sistema com luz ultravioleta e também podem dar resultados falso-positivos com *C. tropicalis*. Os sistemas descritos a seguir estão comercialmente disponíveis:

- Albicans ID (BioMérieux, França): contém reagente cromóforo hexamínico, que resulta em tonalidade azul para colônias de *C. albicans* e cor branca para outras espécies. A identificação presumida desta espécie é feita diretamente no seu isolamento primário. O meio contém gentamicina e cloranfenicol para a inibição do crescimento de bactérias. A identificação pode ocorrer dentro de 24 h, mas, com 72 h, os resultados apontam para maior sensibilidade (taxa de identificação), com valores entre 94 e 100% e especificidade de 86,6 a 99,8%. A sensibilidade do meio para a diferenciação de cultura mista de leveduras é de 93,8%
- CHROMagar (CHROMagar, Becton Dickinson Europe, França): meio cromogênico que serve para o isolamento primário e a identificação presumida de *C. albicans* e outras espécies frequentes em material biológico. As colônias de *C. albicans* desenvolvem, em 48 h, coloração esverdeada, diferentemente de outras espécies. As características morfológicas da cultura também são avaliadas. A acurácia da prova é melhor para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, ficando acima de 95%. O inóculo é um fator de grande influência nos resultados. Algumas espécies apresentam colônias com tonalidades similares, sendo, por isso, indistinguíveis. Apesar de conter cloranfenicol em sua formulação, em alguns casos, bactérias, especialmente *Escherichia coli*, podem se desenvolver no meio e apresentar coloração semelhante à de leveduras.



### Características gerais de alguns gêneros de leveduras de interesse clínico

#### Gênero *Candida*

Este gênero compreende, atualmente, 163 espécies, das quais cerca de 20 já foram associadas a processos infecciosos. Os blastoconídios podem ser globosos, ovóides, cilíndricos, alongados (2,9 a 14,4 µm) e, raramente, triangulares ou ogivais. A reprodução ocorre, em geral, por brotamento multipolar. O pseudomicélio (conjunto de pseudo-hifas) pode ser rudimentar ou bem desenvolvido. Algumas espécies apresentam micélio verdadeiro e *C. albicans* e *C. dubliniensis* produzem clamidósporos em condições apropriadas. A colônia apresenta cor branca ou creme, sem produção de pigmentos carotenoides. A consistência pode variar de cremosa e lisa a rugosa e sulcada. Segundo Kurtzman e Fell (1998), o gênero *Torulopsis* foi incorporado ao gênero *Candida*. Os blastoconídios são pequenos e ovóides e têm 2,5 a 6,0 µm, podendo formar pequenas cadeias ramificadas, mas não formam hifas. Podem apresentar cápsula e não formam compostos semelhantes ao amido.

#### Gênero *Cryptococcus*

A característica principal deste gênero é a formação de blastoconídios globosos, ovais ou raramente alongados (2,0 a 15,0 µm), em regra, cercados por cápsula mucopolissacarídica. Quanto maior a produção de cápsula, maior é a viscosidade da cultura. Algumas espécies produzem pigmentos carotenoides. Degradam compostos fenólicos, por ação da fenol-oxidase, o que resulta em colônias de cor marrom quando na presença de tais compostos. Todas as espécies hidrolisam ureia, assimilam D-glucuronato e inositol, com algumas exceções, não têm capacidade fermentativa e produzem substâncias semelhantes ao amido.

#### Gênero *Rhodotorula*

Os blastoconídios das espécies deste gênero são ovais, esféricos ou alongados (1,6 a 15 µm) e se reproduzem por brotamento multilateral. Pseudomicélio ou micélio verdadeiro são raramente formados. A maior característica deste gênero é a produção de pigmentos carotenoides, que conferem cor salmão-alaranjada às colônias. Podem produzir cápsula, resultando em cultura de aspecto mucoide. Hidrolisam a ureia, não assimilam inositol, não têm capacidade fermentativa e não produzem substâncias semelhantes ao amido.

#### Gênero *Trichosporon*

Os blastoconídios de *Trichosporon* são polimorfos, esféricos, ovais e cilíndricos (3,0 a 20 µm), e sua reprodução é feita por brotamento. O micélio pode ser abundante ou não, mas sempre apresenta é artrosporado. As culturas são, em geral, rugosas, sulcadas e ásperas, de cor branca a amarelo-claro. Este gênero deve ser diferenciado de *Geotrichum*, classificado como levedura segundo Kurtzman e Fell (1998). Espécies de *Geotrichum* produzem somente hifas e artroconídios, sem blastoconídios.

#### Gênero *Malassezia*

Neste gênero são incluídas espécies lipofílicas, como o complexo *M. furfur*, que cresce somente em meios de cultura que contenham lipídios adicionais e espécies que possam crescer em meios comuns de laboratório, como *M. pachydermatis*.

*Malassezia* sp. apresenta blastoconídios pequenos, globosos, elipsoidais ou cilíndricos, com reprodução típica em base larga. Um micélio bem desenvolvido, ocasionalmente, é

formado. Temperatura ótima de crescimento: 35 a 37°C. Não tem habilidade fermentativa. Mais recentemente, várias espécies foram descritas com base em características morfológicas, fisiológicas e moleculares.

#### Gênero *Pichia* (ex-*Hansenula*)

Duas espécies deste gênero têm sido associadas a doenças humanas: *P. anomala*, relacionada com infecções sistêmicas ligadas ao uso de cateteres, e *P. angusta* (ex-*P. polymorpha*), ligada a linfonodos mediastínicos em crianças com doença granulomatosa crônica. A textura das colônias é lisa a enrugada, de cor branca, creme ou bege. Células brotantes multilaterais são observadas ao microscópio. Nenhuma das duas espécies descritas aqui forma micélio ou pseudomicélio. Este gênero caracteriza-se pela formação de ascos com 1 a 4 ascósporos em forma de chapéu. Todos os membros do gênero são nitrato-positivos, e testes de assimilação e fermentação são necessários para a diferenciação específica.

## ► Metodologias auxiliares de diagnóstico micológico

No laboratório de micologia, procura-se utilizar métodos sensíveis, específicos, simples, rápidos e econômicos na detecção e identificação dos agentes patogênicos. Para o diagnóstico dos microrganismos mais comuns, os métodos diretos de diagnóstico com base na demonstração do agente e/ou seu isolamento preenchem os requisitos necessários, apresentando boa sensibilidade. No entanto, no caso de microrganismos oportunistas, de patógenos emergentes ou de crescimento restrito em cultivo, esses métodos não são tão adequados, devido principalmente ao grande número de espécies e ao fato de que as características usadas em sua análise são complexas e frequentemente demandam bastante tempo, o que torna necessário pessoal altamente treinado.

Assim, o diagnóstico de determinadas doenças fúngicas pode ser realizado por observações indiretas usando-se métodos sorológicos ou moleculares.

### ▪ Testes imunológicos

Nos últimos anos, a pesquisa de anticorpos e antígenos no soro de pacientes mostrou ser de grande valor no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da terapia antifúngica. A pesquisa de anticorpos é importante em doenças como paracoccidiodomicose, coccidiodomicose e histoplasmose e a pesquisa de antígeno fúngico no soro, LCR e urina tem comprovada utilidade clínica em criptococose e histoplasmose. A detecção de antígeno polissacarídico no soro e/ou LCR, pelo método de aglutinação de partículas de látex, é procedimento de escolha para diagnóstico rápido de infecção causada por *C. neoformans*. Até o momento, diversos kits estão disponíveis no mercado internacional, todos muito sensíveis e específicos. Ocasionalmente, falsos resultados, positivos e negativos, são observados. Os melhores kits apresentam controles para fator reumatoide, para aumentar a especificidade do teste. Para validar a sensibilidade, concentrações variáveis de polissacarídios (15 ng/mL a 120 ng/mL), são usadas como controle positivo. Alguns kits usam enzima pronase para digerir proteínas interferentes na reação, mas seu valor é discutível e o controle do fator reumatoide é ainda necessário. Esse controle é feito com partículas de látex sensibilizadas com imunoglobina pré-imune.



Testes de aglutinação com partículas de látex e testes imunoenzimáticos para a pesquisa de antígenos de *Candida* e *Aspergillus* são também disponíveis comercialmente. Apesar de haver inúmeros estudos e de alguns produtos já estarem comercializados, o diagnóstico imunológico de candidíase ou aspergilose invasiva ainda precisa de aperfeiçoamento.

## ■ Métodos moleculares

Nos últimos anos, os métodos moleculares tornaram-se mais acessíveis e, em algumas situações, eles deverão ser empregados. Maiores dificuldades diagnósticas são observadas nas doenças oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Nesses casos, tanto os exames micológicos como os sorológicos podem ser ineficientes. Essas infecções progridem rapidamente neste grupo e são frequentemente fatais se o tratamento não for instituído precocemente. Assim, métodos mais sensíveis e rápidos são necessários para realizar o diagnóstico mais prontamente. Esses métodos são empregados nos seguintes aspectos do diagnóstico micológico:

- Identificação de fungos em nível de espécie por meio de alvos de relevância taxonômica
- Diagnóstico clínico precoce de infecções fúngicas invasivas
- Detecção de mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos
- Tipagem molecular de fungos.

A detecção de ácidos nucleicos baseia-se, inicialmente, em métodos de amplificação como o PCR ou outro sistema, para se obter número suficiente de cópias para sua detecção. Em materiais biológicos, o número de células fúngicas pode ser limitado e pode haver também populações mistas, como no caso de secreções respiratórias. Podem ocorrer DNAases e RNAases, que degradam ácidos nucleicos de células fúngicas, assim como inibidores de passos da amplificação podem interferir em sua detecção em espécimes clínicos. Esses problemas estão sendo contornados paulatinamente, e metodologias para melhor concentração e purificação de ácidos nucleicos de espécimes clínicos estão em pleno desenvolvimento. Nessa área, vários trabalhos oferecem essa possibilidade. No entanto, essa metodologia ainda não está amplamente disponível e os custos ainda são altos. Algumas dessas técnicas estão disponíveis na prática clínica diária. Esses métodos podem ser inseridos na rotina dos laboratórios clínicos para complementar a informação fornecida pelos métodos convencionais e, acima de tudo, para ajudar no diagnóstico de casos duvidosos. Atualmente existem vários protocolos para a preparação das amostras, mas nenhum método universal foi descrito como ideal para a extração, purificação e concentração do DNA do fungo em espécimes clínicos. O DNA de fungos pode ser extraído e purificado a partir de diferentes amostras clínicas. No entanto, a eficiência dos métodos de diagnóstico molecular aplicados a diferentes tipos de amostras clínicas podem não ser equivalentes.

Métodos moleculares para diagnóstico baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) e a tecnologia de sondas DNA/RNA são empregadas tanto no diagnóstico quanto na tipagem molecular. O método clássico, embora seja a pedra angular no diagnóstico das micoses, pode levar a dificuldades na identificação dos fungos. Hoje estão disponíveis sistemas comerciais para algumas das doenças fúngicas. A coleta da amostra é essencial, e os testes podem ser realizados em amostras do sangue periférico, fluidos corporais, materiais

obtidos por meio de punção, tecidos frescos e tecidos embebidos em parafina. As técnicas moleculares também podem ser empregadas na determinação de resistência antimicrobiana, no monitoramento de doenças por meio da quantificação da infecção e em estudos epidemiológicos. Para a realização da PCR utiliza-se uma enzima termoestável (DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. A grande vantagem desses métodos é a alta sensibilidade e disponibilidade rápida dos resultados, o que poderia servir como um importante pré-requisito para o início precoce da terapêutica antifúngica. Atualmente, diferentes plataformas moleculares estão disponíveis para a detecção do fungo e para a identificação das espécies. Exemplos de formatos usados incluem PCR padrão, PCR-ELISA, PCR em tempo real (RT-PCR), PCR *nested*, PCR multiplex seguida de microarranjos de DNA, a análise de fragmentos de tamanho variável em regiões do genoma do fungo, sequenciamento de DNA, hibridização de sondas específicas ligadas a microesferas (tecnologia Luminex) e pirosequenciamento.

RT-PCR utiliza uma enzima chamada transcriptase reversa para converter uma amostra de RNA em cDNA antes da etapa de amplificação por PCR, o que permite análises de expressão gênica. PCR *nested*, que emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de iniciadores internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método. Já PCR multiplex é uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo em uma mesma amostra. A PCR a partir de iniciadores randômicos utiliza sequências curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico e é bastante empregado em estudos epidemiológicos. Finalmente, a PCR em tempo real permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente, em um sistema fechado, sendo necessário para isso um termociclador com sistema de monitoramento de emissão de fluorescência. Essa técnica é empregada para a quantificação de amostras, como o monitoramento de doença residual mínima.

Pode-se separar os testes em duas vertentes: qualitativos e quantitativos. Os testes qualitativos visam dar um diagnóstico da presença ou ausência de infecção, normalmente provendo altíssima sensibilidade e especificidade. Já os testes quantitativos têm a função de monitorar a terapêutica. A reprodutibilidade do teste e a observação de boas práticas laboratoriais e de cuidados específicos para exames moleculares são extremamente importantes. Nesse contexto, o controle de qualidade externo é uma das ferramentas que o laboratório deve utilizar para a verificação da qualidade de seus processos, promovendo ajustes quando necessário.

Atualmente, os testes com base em PCR são o método mais comumente utilizado para identificar se a doença é causada por fungo ou não, ou mais especificamente o gênero, a espécie e a até carga fúngica. Os genes mais comumente usados como alvo incluem os genes ribossômicos (rDNA 18s, 28s rDNA, ITS2 e regiões ITS1) e, menos frequentemente, os genes mitocondriais. Os genes escolhidos devem estar presentes em número de cópias múltiplas no genoma do fungo, aumentando assim a sensibilidade de detecção. Em geral, métodos de diagnóstico molecular com genes multicópias são mais sensíveis do que com genes de cópia única. Os genes ribossômicos foram empregados a fim de maximizar a sensibilidade e especificidade. Eles contêm



sequências conservadas que são comuns a todos os fungos, e também domínios variáveis e altamente variáveis como a região ITS. As sequências conservadas podem ser usadas para indicar que se trata de infecção fúngica, enquanto as sequências variáveis podem ser aproveitadas para a identificação.

O uso de sequências oriundas da região ribossômica, como 18S rRNA, 28S rRNA, 5,8S rRNA e ITS, oferecem a possibilidade de detecção de até 2 a 10 células/ml de sangue. No entanto, em amostras clínicas a sensibilidade é menor. O uso da biologia molecular propicia a identificação mais rápida de bolores e leveduras, em comparação com métodos fenotípicos. A sensibilidade é relativamente boa e pode amplificar organismos não viáveis. Devido à rapidez do resultado, uma das vantagens é poder iniciar mais precocemente a aplicação de terapia apropriada.

Os testes moleculares são também aplicados a estudos epidemiológicos por técnicas denominadas “DNA fingerprint”. Assim, pode-se saber a possível origem de uma cepa em surtos ocorridos em hospitais ou outros locais. Outra possibilidade é o seu uso em técnicas de hibridização *in situ* em cortes histológicos.

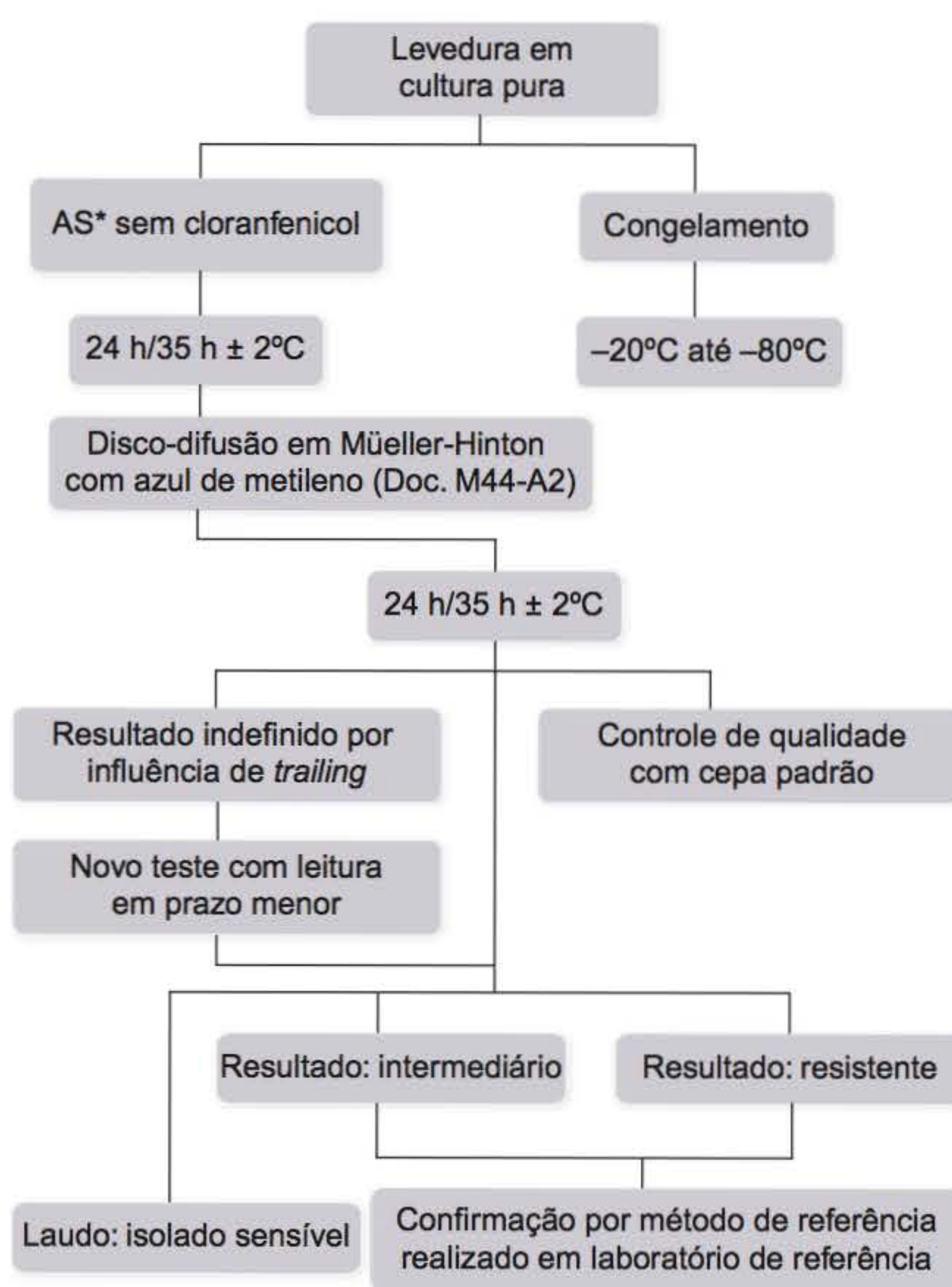
Assim, os testes moleculares podem ser rápidos, específicos e relativamente econômicos. São especialmente úteis em casos de microrganismos não cultiváveis ou de crescimento lento, pleomórficos, oportunistas ou raros.

Por outro lado, os resultados devem ser criteriosamente analisados para assegurar a validade dos achados, principalmente quando se trata de espécimes clínicos com infecções mistas, como escarro ou secreções de outros locais não estéreis, bem como no acompanhamento da terapêutica.

### ▪ Testes de sensibilidade a antifúngicos

Para a terapia das infecções fúngicas existem vários fármacos antifúngicos com atividade e espectro de ação distinta. Anfotericina B, 5-fluoritosina, imidazóis (cetonazol, miconazol), triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol), equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) e alilaminas (terbinafina, butenafina) são os mais utilizados. Para orientação da melhor conduta terapêutica, métodos para determinação *in vitro* de resistência a fármacos podem ser utilizados na prática clínica, e a crescente disponibilidade de métodos comerciais tem viabilizado seu uso em laboratórios assistenciais. Na Figura 32.9 é apresentada uma proposta de algoritmo com base em métodos de referência, para determinação da sensibilidade de leveduras aos principais antifúngicos para infecções invasivas.

Os testes de sensibilidade a antifúngicos (TSA) passaram por longo e complexo processo de padronização no final do século passado. O Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), até 2005 denominado NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), nos Estados Unidos, contribuiu de modo significativo para a normatização de técnicas de referência. Métodos para avaliação da suscetibilidade das principais leveduras e fungos filamentosos de interesse médico estão publicados e são, continuamente, aperfeiçoados (Quadro 32.7). No entanto, os pontos de corte para interpretação dos resultados (*breakpoints*) estão definidos apenas para o gênero *Candida* diante de um número considerável de antifúngicos.



**Figura 32.9** Algoritmo para teste de triagem da suscetibilidade de isolados de *Candida* spp. ante fluconazol e voriconazol. AS = ágar Sabouraud.

Os métodos de referência são recomendados para avaliação de atividade inibitória de anfotericina B, 5-fluoritosina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol e equinocandinas. O meio de cultura líquido, sintético e quimicamente denominado Roswell Park Memorial Institute (RPMI), é o recomendado para a diluição da solução-mãe dos antifúngicos e preparação do inóculo. A incubação da reação é feita à temperatura de 35°C durante 24 a 72 h, conforme o crescimento da espécie. Cepas-controle são obrigatórias para todos os testes. A Figura 32.10 ilustra duas placas de microtitulação que contêm testes de suscetibilidade para leveduras e fungos filamentosos demácios.

A última versão do documento para fungos filamentosos recomenda os parâmetros para testes com *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus* e outros zigomicetos, *Pseudallescheria boydii* (fase perfeita de *Scedosporium apiospermum*), *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Scedosporium prolificans*, fungos demácios e *Sporothrix schenckii* na fase filamentosa. Os antifúngicos incluídos no método foram fluconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, flucitosina, anfotericina B, terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e equinocandinas (anidulafungina, caspofungina, micafungina).

Testes com os fungos dimórficos *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum* e *Penicillium marneffe* não foram, e nem são ainda hoje, recomendados.



**Quadro 32.7 - Documentos atuais de referência para execução e interpretação de resultados de testes de suscetibilidade a antifúngicos.**

Agente	Método	Documento de referência	Autoria	Ano da publicação
<i>Candida</i> spp.	Discodifusão	M44-A2 Suplemento M44-S3	CLSI	2009
<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus neoformans</i>	Microdiluição	M27-A3 Suplemento M27-S3	CLSI	2008
Leveduras fermentadoras ( <i>Candida</i> spp.)	Microdiluição	E.DEF. 7.1	EUCAST	2008
<i>Candida</i> spp.	Microdiluição	Nota técnica sobre fluconazol	EUCAST	2007
<i>Candida</i> spp.	Microdiluição	Nota técnica sobre voriconazol	EUCAST	2008
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Bipolaris</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Rhizopus oryzae</i> e outros Mucorales, <i>Pseudallescheria boydii</i> e <i>Scedosporium prolificans</i>	Discodifusão	M51-P Suplemento M51-S1	CLSI	2009
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> (fase filamentosa), dermatófitos, <i>Scedosporium prolificans</i> , fungos demácios e zigomicetos	Microdiluição	M38-A2	CLSI	2008
Fungos filamentosos esporulados	Microdiluição	E.DEF. 9.1	EUCAST	2008

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)); EUCAST = EUCAST Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST AFST) ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).



**Figura 32.10** Método de referência de microdiluição realizado em placas de microtitulação para a determinação da sensibilidade de leveduras e fungos demácios. (Gentileza de Maria Walderez Szeszs.)

O European Committee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST), da European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), dedicou-se a estudar os parâmetros propostos para os métodos de referência e a propor alterações com vistas à melhoria do teste. Além disso, esse comitê europeu desenvolveu estudos para definir *breakpoints* e aprovou métodos também considerados de referência para leveduras fermentadoras e fungos filamentosos, com proposta de novos pontos de corte. O Quadro 32.8 mostra os distintos pontos de corte segundo os métodos de referência. A diferença nos valores propostos deve-se, principalmente, aos proces-

sos distintos utilizados para a definição dos pontos de corte (Quadro 32.9). Para o comitê europeu, na determinação de pontos de corte, uma das fases primordiais é a construção da curva normal dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados para isolados considerados selvagens (sem mecanismo de resistência adquirida). Isolados que apresentam resistência (não selvagens) podem ser identificados por sua menor suscetibilidade quando comparada ao maior valor de CIM da população selvagem. O comitê EUCAST definiu o valor máximo de CIM da população selvagem como o ponto de corte epidemiológico (*epidemiological cut-off value*).

**Quadro 32.8 - Pontos de corte (*breakpoints*) dos principais antifúngicos segundo os órgãos de referência norte-americano CLSI e europeu EUCAST para sensibilidade (mg/ℓ) de leveduras do gênero *Candida*.**

Antifúngico	CLSI				EUCAST*		
	Sensível	S-DD <sup>a</sup>	Resistente	Não sensível	Sensível	Intermediário	Resistente
Fluconazol	< 8	16 a 32	≥ 64	—	≤ 2	4	> 4
Itraconazol	≤ 0,125	0,25 a 0,5	≥ 1	—	NI	NI	NI
Voriconazol	< 1	2	≥ 4	—	≤ 0,125	—	> 0,125 <sup>b</sup>
Caspofungina	≤ 2	NI	NI	> 2	NI	NI	NI
Micafungina	≤ 2	NI	NI	> 2	NI	NI	NI
Anidulafungina	≤ 2	NI	NI	> 2	NI	NI	NI
5-fluorocitosina	≤ 4	8 a 16	≥ 32	—	NI	NI	NI

\*Pontos de corte aplicáveis para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*; <sup>a</sup>S-DD = suscetibilidade dependente da dose; <sup>b</sup>Valores de CIM acima de 0,125 mg/ℓ são raros e, por isso, outras categorias ainda não podem ser definidas. No entanto, até que se tenha evidência sobre a evolução clínica relacionada com isolados com CIM acima desse valor, estes devem ser classificados como resistentes; NI = não indicado até o momento.



**Quadro 32.9 • Etapas do processo de definição de pontos de corte (*breakpoints*) segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o European Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST).**

Etapas	EUCAST	CLSI
1	Identificação das dosagens mais usadas em cada país europeu	Exame dos dados microbiológicos disponíveis
2	Definição do perfil de suscetibilidade da população selvagem ( <i>wild type</i> ) de cada espécie. Determinação dos pontos de corte ( <i>cut-offs</i> ) epidemiológicos	Conhecimento dos mecanismos de resistência, sua relação com valores de CIM e evolução clínica
3	Exame farmacocinético	Exame dos parâmetros farmacocinéticos pertinentes
4	Exame da farmacodinâmica, incluindo a simulação de Monte Carlo	Exame dos parâmetros farmacodinâmicos
5	Estudo da correlação entre valores de CIM e evolução clínica de casos tratados com o antifúngico	Análise de dados de evolução clínica

Adaptado de Cuenca-Estrella e Rodríguez-Tudela, 2010.

Os esforços empreendidos pelo CLSI, assim como pelo EUCAST, no desenvolvimento de métodos de referência têm como princípios estabelecer procedimentos reprodutíveis, que deem resultados comparáveis e que possam ser interpretados sob o ponto de vista clínico. Embora os métodos norte-americanos e europeus apresentem diferenças metodológicas (Quadro 32.10) em certos aspectos, os resultados são similares e apresentam concordância  $\geq 92\%$  para os principais antifúngicos.

Os métodos de referência, por suas características, são complexos e trabalhosos e, por isso, são destinados apenas a laboratórios especializados e que executam rotineiramente esses testes. O papel atual dos testes de referência para determinação de suscetibilidade a antifúngicos pode ser resumido nas seguintes funções:

- Desenvolver pontos de corte (*breakpoints*) para a interpretação dos resultados dos testes
- Monitorar a resistência a antifúngicos
- Prover protocolo padronizado de base para avaliação e comparação de novas técnicas e de ação de novos fármacos antifúngicos
- Determinar a suscetibilidade de espécies incomuns e emergentes.

A padronização de métodos para leveduras e fungos filamentosos, pelo CLSI e o EUCAST, serviu para o desenvolvimento de muitos sistemas comerciais automatizados e semiautomatizados com base em difusão em ágar ou em técnicas com

indicadores colorimétricos de oxirredução, que constituem boas alternativas para a determinação de resistência em laboratórios assistenciais, de análises clínicas e hospitalares. A maioria dos microbiologistas prefere usar sistemas comerciais que apresentem vantagens, como simplicidade técnica, economia de reagentes e produção de resultados rápidos (24 a 48 h).

O método de discodifusão em ágar, descrito nos documentos da série M44 (CLSI) e utilizado para a determinação da suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* diante de fluconazol e voriconazol, é considerado referência e pode ser usado para a triagem de isolados sensíveis, intermediários e sensíveis. Para o teste, é empregado ágar Mueller-Hinton suplementado com 0,2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno. O documento mais recente (M44-A2), publicado em 2009, inclui critérios de interpretação para os diâmetros de halos obtidos com discos de fluconazol, caspofungina e voriconazol. Um controle de qualidade deve ser realizado contemplando valores esperados para as cepas padrão desses antifúngicos. Seus resultados, no entanto, devem ser monitorados pelo método de diluição em meio líquido (CLSI ou EUCAST). Os discos podem ser preparados no próprio laboratório ou ser adquiridos no comércio (Sensifungidisc®, CECON BR; Neo-Sensitabs®, Rosco, Su; Discos de fluconazol, Instituto Malbrán, Ar). A leitura automatizada (Wideryst®, Soria Melguizo, Espanha) também pode ser empregada para leitura dos halos de inibição, mas apresenta limitações sérias no caso de isolados com crescimento residual (fenômeno *trailing*).

**Quadro 32.10 • Diferenças entre os métodos de referência norte-americano CLSI e europeu EUCAST, para determinação de resistência em leveduras.**

Características	M27-A3 (CLSI, 2008)	E.DEF.7,1 (EUCAST, 2008)
Forma das placas de microtitulação	Fundo redondo	Fundo plano
Concentração de glicose no meio de cultura RPMI 1.640 em 0,165 M MOPS, pH 7	0,2%	2% glicose
Concentração do inóculo (ufc/mL)	0,5 a $2,5 \times 10^3$	0,5 a $2,5 \times 10^5$
Tempo de incubação	<i>Candida</i> spp. 24-48 h <i>Cryptococcus neoformans</i> 72 h	<i>Candida</i> spp. 24 h
Leitura da reação da inibição	Visual	Espectrofotométrica (leitora de placas)
Ponto de leitura da reação de inibição ( <i>end point</i> ) para anfotericina B	Menor concentração que inibe totalmente o crescimento (pontuação zero de crescimento), orifício opticamente claro	Menor concentração que inibe 90%, ou mais, do crescimento azóis: redução de 50%
Ponto de leitura da reação de inibição ( <i>end point</i> ) para drogas azólicas, equinocandinas e 5-fluorocitosina	Menor concentração que inibe significativamente, ou mais, o crescimento (pontuação 2+ de turbidez), inibição proeminente	Menor concentração que inibe 50%, ou mais, do crescimento, em comparação com aquele obtido no controle positivo (sem antifúngico)

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute, disponível em: [www.clsi.org](http://www.clsi.org); EUCAST = Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing, disponível em: [www.eucast.org](http://www.eucast.org).



O teste comercial, também fundamentado em difusão em ágar, que emprega fita impregnada (Etest®, AB Biodisk, Suécia) com concentrações definidas de determinado antifúngico, apresenta resultados confiáveis de CIM, desde que utilizado por técnicos capacitados. A correlação entre os resultados obtidos por esse teste e aqueles de métodos de referência varia de modo considerável, dependendo da espécie e do antifúngico empregado. Assim, é obrigatório o controle de qualidade externo com método de referência (CLSI ou EUCAST).

O método de microdiluição já está disponível no comércio internacional (Sensititre YeastOne®, Trek Diagnostic Systems, EUA).

Outros métodos automatizados ou semiautomatizados (ASTY®, Kyokuto Inc; Fungitest®, Bio-Rad; Vitek®, BioMérieux; ATB Fungus®, BioMérieux) foram amplamente avaliados em estudos que mostram alto grau de concordância com métodos de referência.

Vale ressaltar que a determinação do perfil de suscetibilidade de espécies raras e emergentes deve ser restrita a laboratórios de referência, tendo como base os procedimentos de referência.

A identificação da espécie de um determinado agente etiológico, na grande maioria das vezes, permite a abordagem terapêutica adequada ante o perfil conhecido do patógeno em questão. Para espécies com suscetibilidade variável, ou imprevisível, ou em casos refratários ao tratamento, ou mesmo naqueles submetidos à profilaxia com antifúngicos, o teste de suscetibilidade deve ser realizado com sistemas comerciais para o manejo de casos particulares.

Os sistemas disponíveis no comércio são úteis, particularmente, para indicar isolados de *Candida* spp. resistentes, *in vitro*, ao fluconazol e outros fármacos azólicos. Discrepâncias substanciais entre valores de CIM desses fármacos obtidos por sistemas comerciais são incomuns e erros graves (isolados resistentes classificados de modo incorreto como sensíveis por sistema comercial) são relatados em taxas inferiores a 5%. Alguns desses sistemas mostraram-se úteis para detectar cepas insensíveis às equinocandinas. A identificação de isolados resistentes à anfotericina B, no entanto, parece ser mais difícil, mesmo porque os métodos de referência são falhos na detecção de tais fenótipos e, desse modo, comparações fidedignas não podem ser realizadas até o momento. Procedimentos para avaliação da eficácia fungicida *in vitro* da anfotericina B, como concentração fungicida mínima e curvas de morte, são indicados na literatura, mas ainda carecem de padronização e interpretação para indicação de seu uso na prática clínica.

Os métodos de referência, além de terem pouca sensibilidade para indicar cepas resistentes à anfotericina B, provavelmente devido aos procedimentos empregados, ainda apresentam outros problemas de ordem técnica, como, por exemplo, pouco crescimento de cepas de *Cryptococcus neoformans*. Porém, o maior deles é, sem dúvida, o crescimento residual do inóculo de certos isolados, atribuído à ação fungistática do fármaco. A esse fenômeno, denominado *trailing*, é atribuída a grande maioria dos erros em testes de sensibilidade a fármacos azólicos e 5-fluorocitosina em ensaios com *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Para outras espécies, o fenômeno também pode ocorrer. Em métodos que empregam ágar, o fenômeno resulta na formação de microcolônias coalescentes (Figuras 32.11 a 32.13) ou colônias isoladas dentro do halo de inibição (Figura 32.14). No método de diluição em meio líquido, verifica-se crescimento (turbidez) residual do isolado em concentrações acima da CIM. *Trailing* induz resultados falsos de resistência em testes realizados por técnicos pouco



**Figura 32.11** Método de discodifusão com *Candida tropicalis* sensível à anfotericina B e apresentando *trailing* ao fluconazol, caracterizado por microcolônias isoladas dentro do halo de inibição.



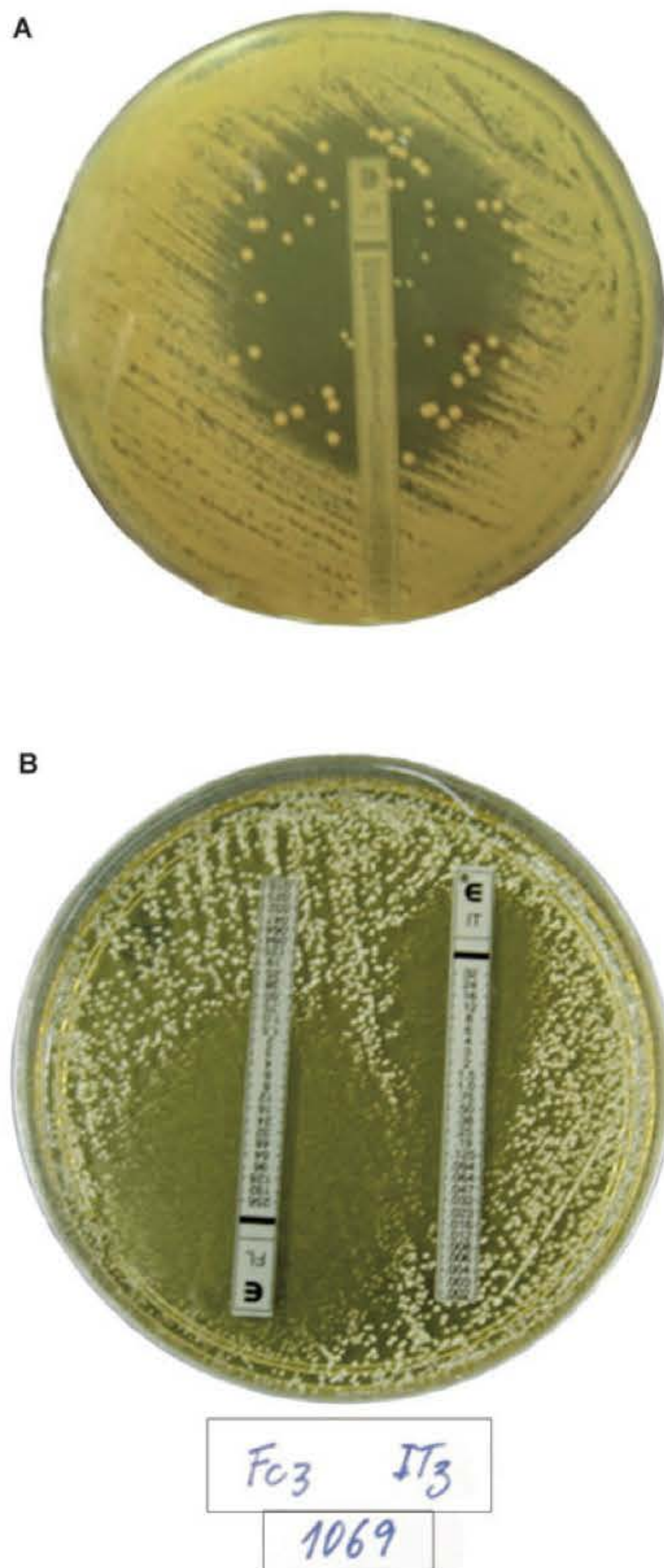
**Figura 32.12** Fenômeno *trailing* em teste de suscetibilidade por discodifusão ao fluconazol em isolado de *Cryptococcus neoformans*. Sob efeito *trailing* a cultura é parcialmente inibida e forma um anel de microcolônias dentro do halo de inibição de fluconazol. (Gentileza de Allan Antônio Kubo.)

experientes. Isolados resistentes (Figura 34.15) devem ser distinguidos de isolados com sensíveis que apresentam o fenômeno *trailing* em testes com substâncias fungistáticas.

Ao lado de todos esses desafios, a questão maior que se impõe no estudo da suscetibilidade aos antifúngicos por métodos de referência é a carência de pontos de corte para interpretar os resultados de CIM. As falhas terapêuticas relacionadas com o encontro de altos valores de CIM reforçam a premência da definição da correlação clinicolaboratorial. Com pontos de corte definidos pode-se monitorar e verificar tendências das taxas de resistência de espécies novas, bem como daquelas já tradicionalmente reconhecidas como patógenos.

Um dos grandes marcos foi o relato de cepas resistentes de espécies de *Candida* ao fármaco mais usado para infecções fúngicas, o fluconazol. Houve grande preocupação sobre o incremento de resistência devido ao uso abusivo desse antifúngico. A resistência, no entanto, foi amplamente documentada em isolados obtidos de indivíduos com AIDS e quadro recorrente de candidíase orofaríngea, sendo incomum em amostras de hemocultura, como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. No entanto, outras espécies são, intrinsecamente, resistentes a fluconazol (*Candida krusei*) e outras espécies podem desenvolver, rapidamente, resistência secundária (*Candida glabrata*).



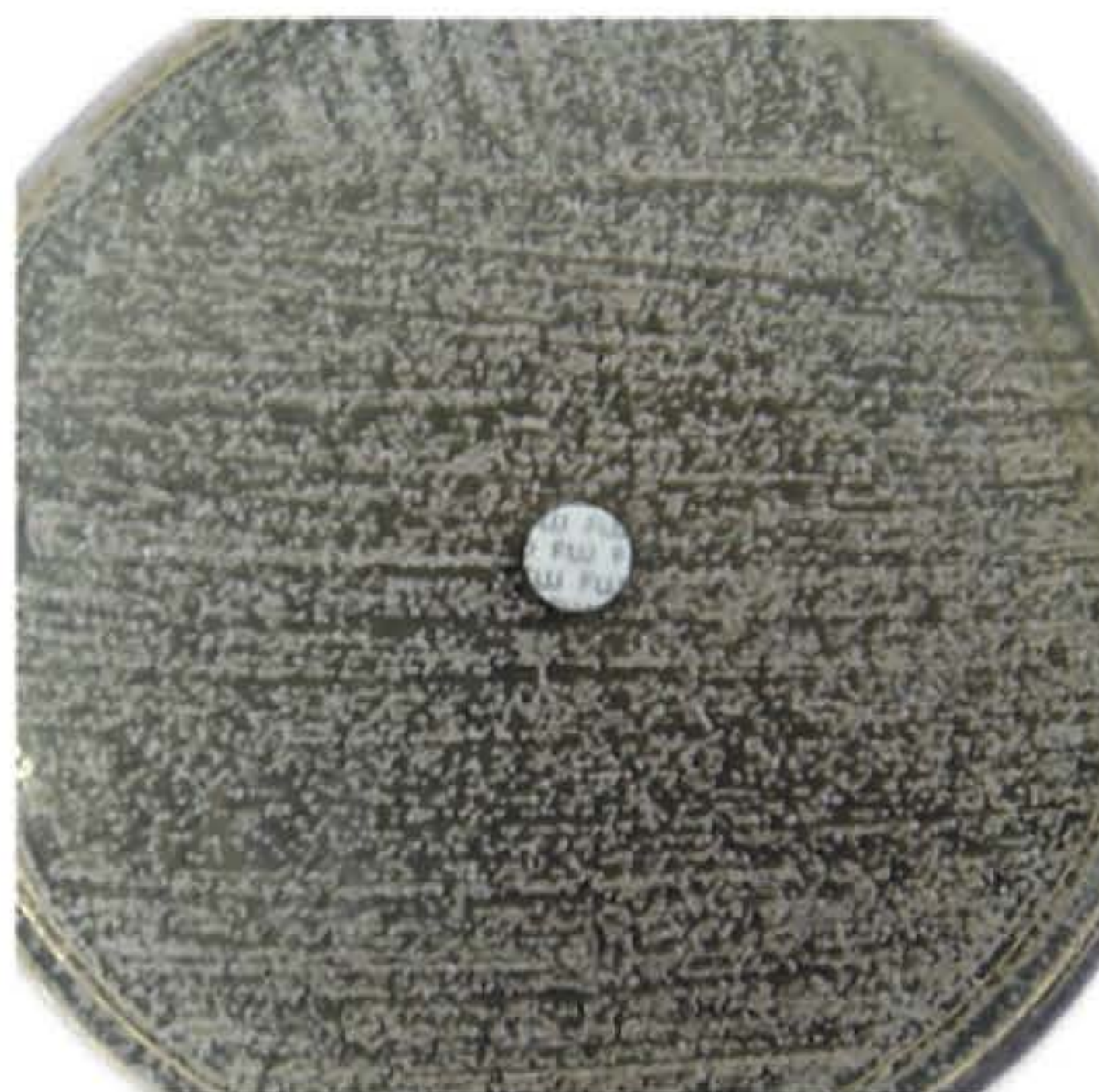


**Figura 32.13 A.** Método de discodifusão para a determinação de suscetibilidade de isolado de levedura por método de difusão por fitas impregnadas. **B.** Fenômeno *trailing* (microcolônias) dentro das duas elipses formado pela inibição parcial dos fármacos azólicos. (Gentileza de Maria Walderez Szeszs.)

As taxas de resistência em isolados de hemocultura, dada a gravidade das infecções de corrente sanguínea por leveduras, são continuamente monitoradas em diversos países e continentes. Alguns excelentes estudos de vigilância populacional foram publicados sobre a etiologia das candidemias e as taxas de resistência aos principais antifúngicos. Muitos desses estudos, realizados na América do Norte, indicaram acréscimo significativo de espécies de *Candida* com resistência ao fluconazol, em particular, *C. glabrata*. Em 2.019 pacientes com candidemia comprovada, internados em 23 centros hospitalares, foram avaliados evolução clínica e dados de laboratório. *Candida albicans* foi a espécie mais comumente identificada (45,6%); entretanto, o conjunto de espécies não *C. albicans* superou essa espécie (54,4%), sendo constituído de *C. glabrata* (26%), *C. parapsilosis*



**Figura 32.14** Fenômeno *trailing* caracterizado por colônias isoladas dentro do halo de inibição ao fluconazol. (Gentileza de Kayzer José Ferreira Alves.)



**Figura 32.15** Exemplo de isolado resistente ao fluconazol em método de discodifusão. (Gentileza de Aparecida de Fátima Meneghin.)

(15,7%), *C. tropicalis* (8,1%) e *C. krusei* (2,5%). No entanto, na maior parte dos estudos de vigilância ativa, a porcentagem de espécies consideradas resistentes a fluconazol, como *C. glabrata* e *C. krusei*, situa-se abaixo de 15%. É de grande importância o conhecimento desse dado, segundo a região geográfica, pois a terapia empírica com fluconazol não deve ser recomendada nas regiões com maior número de casos de candidemia.

Quando são usados os pontos de corte específicos de cada comitê – CLSI ou EUCAST –, as taxas de resistência para fluconazol e voriconazol, descritas na literatura mundial, são semelhantes, independentemente do método empregado nos estudos. Um panorama dos relatos de resistência aos principais azóis usados no tratamento das candidíases invasivas é apresentado no Quadro 32.11.



**Quadro 32.11 - Taxas de resistência em isolados de leveduras causadores de infecções invasivas ante fluconazol e voriconazol segundo metodologia de referência.**

Espécie	Antifúngico	Metodologia	
		CLSI	EUCAST
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	1%	1%
	Voriconazol	< 0,5%	< 0,5%
<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	3%	1%
	Voriconazol	< 0,5%	< 0,5%
<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	4%	4%
	Voriconazol	< 0,5%	< 0,5%

Para a anfotericina B, as taxas de resistência ainda não foram definidas e é empregado, na maioria dos estudos, o valor de CIM  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  para indicar isolados resistentes. Dada a inexistência desse parâmetro interpretativo, é importante conhecer os valores de CIM encontrados em testes com as principais espécies de leveduras de interesse médico para balizar os resultados obtidos na rotina laboratorial (Quadro 32.12).

Altos valores de CIM de equinocandinas (CIM  $\geq 4 \text{ mg}/\ell$ ) são raros, mesmo entre isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, espécies consideradas menos sensíveis *in vitro* a esses fármacos. Esses valores maiores foram descritos em menos de 1% de isolados clínicos de *C. parapsilosis*, tanto para caspofungina quanto para micafungina, e em porcentagem de 7% para anidulafungina. Deve-se ressaltar que a resistência *in vitro* a equinocandinas deve ser confirmada pela detecção de mutação no gene *FKS1*, desde que os pontos de corte parecem ser inadequados para classificar muitos isolados com valor alto de CIM.

Em relação a outros gêneros de leveduras de interesse médico, os dados são ainda limitados, até mesmo por sua menor incidência. É notório, porém, o aumento de relatos de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* resistentes ao fluconazol.

A prevalência de resistência *in vitro* em cepas de fungos filamentosos é pouco conhecida. Pontos de corte para uso clínico não foram, ainda, estabelecidos para esse grupo heterogêneo de fungos, e muitos especialistas utilizam os pontos de corte epidemiológicos (*cut-offs*) da população selvagem para interpretar resultados de CIM, em especial para *Aspergillus fumigatus*, diante de fármacos azólicos (www.eucast.org). Segundo o valor máximo de CIM encontrado para essa espécie, a taxa de resistência *in vitro* é baixa, apesar de não existirem muitos estudos epidemiológicos bem delineados para essa avaliação. Alguns países registraram taxas de resistência *in vitro* ao redor

de 5%, tanto ao itraconazol quanto ao voriconazol. A porcentagem de resistência a esses fármacos pode chegar ao dobro em países como a Holanda. A resistência *in vitro* à anfotericina B, por outro lado, é muito frequente em isolados clínicos de *Aspergillus terreus*.

Cepas multirresistentes de fungos filamentosos oportunistas, em particular entre isolados de zigomicetos, *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp., são, constantemente, descritas. Muitos atribuem essa ocorrência ao uso maciço de voriconazol para o tratamento de aspergilose invasiva, em certas regiões, e alguns a relacionam com o uso empírico de equinocandinas para a terapia de infecções fúngicas invasivas. A hipótese mais plausível é de que o aumento significativo desses agentes deve-se à prevalência cada vez maior de fatores predisponentes, dado que a maior parte dos pacientes com infecções oportunistas por esses fungos foi submetida a quimioterapia imunossupressora ou transplantes de células hematopoéticas ou órgãos sólidos. Ao lado desses fatores, deve-se lembrar que a descoberta de novos antifúngicos, com distintos mecanismos e espectro de ação, foi acompanhada por grande desenvolvimento de técnicas acuradas de diagnóstico e identificação de espécies que podem ter sido subestimadas até anos recentes.

A vigilância de fenótipos de resistência em patógenos emergentes, bem como nos tradicionais, deve ser realizada com métodos de referência, levando-se em conta as distintas propostas de pontos de corte dos comitês. Importantes dados sobre infecções fúngicas são fornecidos por estudos epidemiológicos que mostram diferenças marcantes entre países, tanto na distribuição de espécies quanto na suscetibilidade a antifúngicos, o que ressalta a necessidade de ações de vigilância. A prescrição de antifúngicos com base em dados obtidos de inquéritos epidemiológicos realizados em outras áreas geográficas é incorreta. Por exemplo, alguns estudos mostraram aumento de incidência de espécies de *Candida* resistentes a fluconazol em certos países. Entretanto, em outras regiões foi notificado incremento de infecções por espécies sensíveis, como *C. parapsilosis*, e insignificante aumento na taxa de resistência *in vitro* a fármacos azólicos. Em relação a outros antifúngicos, as taxas de resistência são muito baixas quando os pontos de corte do CLSI ou EUCAST são usados para interpretar resultados de CIM.

Um dos grandes desafios no que diz respeito à resistência a antifúngicos é a identificação de multirresistência em agentes de micoses invasivas causadas por espécies pouco frequentes, como *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Fusarium* e *Scedosporium*, além de fungos do grupo dos zigomicetos. A detecção adequada de cepas ou espécies resistentes por métodos reprodutíveis e fiáveis, bem como a interpretação dos resultados de CIM, é a meta de muitas investigações e deve-se tornar, em futuro próximo, uma poderosa ferramenta para o manejo das infecções letais por esses agentes.

**Quadro 32.12 - Sensibilidade (mg/ℓ) de isolados clínicos ante a anfotericina B segundo metodologia EUCAST.**

Espécie	N	MIC50	MIC90	Intervalo	% de resistência ( $\geq 2 \text{ mg}/\ell$ )
<i>C. albicans</i>	1,12	0,06	0,50	0,03 a 2,0	0,2
<i>C. parapsilosis</i>	749	0,50	1,0	0,03 a 2,0	2,0
<i>C. tropicalis</i>	343	0,25	0,50	0,03 a 4,0	1,1
<i>C. glabrata</i>	295	0,12	0,50	0,03 a 2,0	0,30
<i>C. krusei</i>	157	0,50	1,0	0,06 a 2,0	4,4

MIC50, valor que inibe 50% do total de isolados; MIC90, valor que inibe 90% dos isolados. Adaptado de Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela, 2010.



## Conceitos e definições utilizados em testes de suscetibilidade a antifúngicos

### Antifúngico

Substância de origem biológica, semissintética ou sintética, que inibe o crescimento ou tem ação letal sobre fungos. Desinfetantes, antissépticos e preservativos não estão incluídos nesta definição.

### Potência

Atividade antimicrobiana de uma substância determinada por bioensaio e comparada com a substância pura p.a. (pró-análise). A potência pode ser expressa em fração da massa (mg/g), parte ativa da substância (unidades internacionais – UI/g), porcentagem de volume ou massa, ou ainda, mol/l.

### Concentração

Quantidade de um fármaco em determinado volume. A concentração é expressa em mg/l; apesar de mg/l ser igual a µg/ml, a primeira forma é a correta.

### Solução-mãe

Solução inicial usada para diluições adicionais.

### Concentração inibitória mínima

- Sinônimos: CIM ou MIC (*minimum inhibitory concentration*).

Menor concentração de um fármaco que inibe o crescimento de determinado microrganismo dentro de um período de tempo definido. CIM é expresso em mg/l.

### Pontos de corte

- Sinônimo: *breakpoints*.

Valores de CIM estabelecidos por comitês especializados para classificar um microrganismo em categorias de uso clínico: sensível, intermediário e resistente. Os pontos de corte podem ser alterados segundo determinadas circunstâncias, como a mudança nas doses recomendadas do fármaco.

Isolado sensível é aquele inibido, *in vitro*, por uma concentração de determinado antifúngico (no caso específico) associada a alta possibilidade de sucesso terapêutico.

Isolado intermediário é aquele inibido, *in vitro*, por uma concentração de determinado antifúngico associado a efeito terapêutico duvidoso; a doença, neste caso, pode ser tratada adequadamente se o fármaco estiver concentrado no local da infecção e quando altas doses puderem ser administradas. Esta categoria previne que fatores técnicos incontrolados possam causar grandes discrepâncias na interpretação de resultados.

Isolado resistente é aquele inibido, *in vitro*, por uma concentração de determinado antifúngico associada a alta possibilidade de falha clínica.

### Resistência secundária

- Sinônimo: resistência adquirida.

Aquela que aparece em um isolado previamente sensível após sua exposição ao fármaco.

### Resistência intrínseca

- Sinônimos: resistência primária, resistência inata.

Aquela inerente, ou não adquirida, que caracteriza todos os isolados, ou a maioria dos membros da espécie; a atividade antimicrobiana do fármaco é insuficiente, ou a resistência inata é tão comum, que torna seu uso clínico insignificante e o teste de suscetibilidade desnecessário.

### Isolado selvagem (wild type)\*

Isolado sem mecanismo de resistência adquirida a um determinado antifúngico, que pode ou não responder clinicamente a determinado tratamento antimicrobiano. Um isolado é classificado como selvagem por pontos de corte epidemiológicos.

### Isolado não selvagem (non-wild type)

Isolado para o qual tenha sido descrita resistência adquirida para determinado antimicrobiano; pode ou não responder clinicamente a determinado tratamento antimicrobiano; classificado por pontos de corte epidemiológicos.

### Pontos de corte epidemiológicos (epidemiological cut-off values)

Valores de CIM que determinam a distribuição normal (curva normal) dos isolados selvagens.

### Cepa padrão

Cepa catalogada que apresenta genótipo e fenótipo bem definidos e estáveis; obtida de coleção de cultura certificada e usada como controle de qualidade dos testes.

### Teste de suscetibilidade em meio líquido

Ensaio no qual uma série de diluições seriadas (em regra, em razão 2) de determinado antifúngico é realizada em meio líquido; a cada concentração resultante do antifúngico é adicionado inóculo do fungo (UFC/ml), seguido de incubação por período e temperatura predefinidos; se usados pequenos volumes de reagentes em placas de microtitulação, o ensaio é denominado microdiluição. O objetivo do ensaio é a determinação da CIM.

### Crescimento residual (fenômeno trailing)

Fenômeno que ocorre em testes com fármacos fungistáticos (p. ex., azóis e 5-fluorocitosina) diante de determinadas espécies; resulta em resultados falso-positivos de resistência ao antifúngico.

## ► Micoses superficiais

Micoses superficiais são processos não invasivos e basicamente assintomáticos, que acometem camadas mais externas da pele ou uma porção suprafolicular dos pelos. As doenças são essencialmente de interesse cosmético, envolvendo mudanças na pigmentação da pele (pitíriase versicolor ou tinha negra) ou formação de nódulos ao longo dos pelos (piedra branca e preta).

### ▪ Pitíriase versicolor | Infecções causadas por espécies de *Malassezia*

O gênero *Malassezia* é responsável pela pitíriase versicolor, micose superficial de distribuição universal. Embora ocorra em todo o mundo, sua frequência é variável e depende das diferentes condições climáticas, profissionais e socioeconômicas. A pitíriase versicolor manifesta-se como lesões maculares múltiplas, inicialmente perifoliculares, com descamação fina, de coloração variável, do branco ao acastanhado, podendo,

\*O banco de dados pode ser acessado em: [www.eucast.org](http://www.eucast.org)



ainda, tornar-se eritematosa. A maior parte dos casos apresenta máculas hipocrômicas, e com menor frequência são observados indivíduos com máculas hiperocrômicas, ou com ambas as formas. Lesões foliculares são citadas na literatura, assim como quadros com intensa despigmentação cutânea, caracterizando a chamada acromia parasitária, e a forma rara de pitíriase versicolor atrófica associada ao uso prolongado de corticosteroides tópicos. Estudos demonstram um papel causal para *Malassezia* também em dermatite seborreica.

*Malassezia* spp. compõe a flora normal da pele, principalmente do folículo piloso. Algumas condições podem intensificar o crescimento de *Malassezia* e levar a manifestações clínicas. Entre os principais fatores que estimulam o desenvolvimento de pitíriase versicolor estão o uso de agentes antimicrobianos, corticoterapia, alergia, alterações hormonais e nutricionais, além de outras doenças, como neoplasias e doenças imunossupressoras. Essas manifestações provocam alterações físicas e químicas e respostas imunológicas que normalmente restringem a colonização.

Em algumas situações clínicas, a colonização por *Malassezia* pode evoluir para quadro de fungemia. Geralmente, ocorre em crianças recém-nascidas que recebem alimentação parenteral com suplementação lipídica. Acredita-se que essa suplementação facilite a colonização da levedura no cateter utilizado para alimentação.

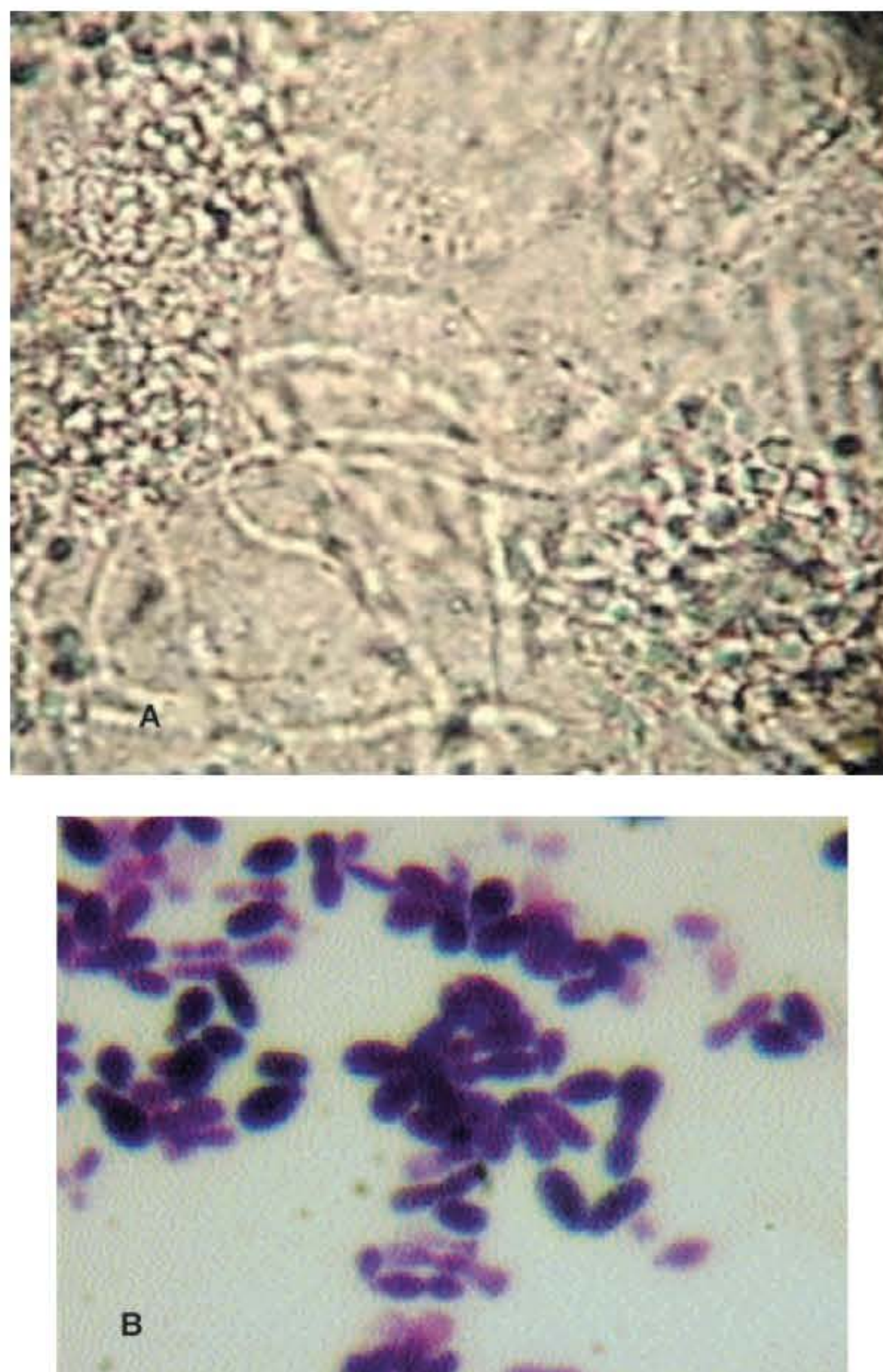
Devido à similaridade morfológica de seus membros, o gênero ficou limitado durante muito tempo à *Malassezia furfur*, levedura lipídio-dependente responsável por várias manifestações cutâneas em humanos, e à *Malassezia pachydermatis*, espécie lipofílica, mas capaz de crescer em meios que contenham ácidos graxos de cadeia curta e considerada agente de doenças em animais.

O gênero *Malassezia* foi reclassificado com base na morfologia, fisiologia e biologia molecular, e então foram identificados *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. sympodialis* e *M. sloofiae*. A partir do estudo de pacientes com dermatite atópica, novas espécies foram propostas: *M. dermites*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* e, mais recentemente, espécies relacionadas com animais, *M. equinum* e *M. caprae*, por análise ribossômica. Além de ter interesse de cunho epidemiológico, o uso de ferramentas moleculares como complemento ao exame micológico tem sido intensificado por outros motivos. As variações na sensibilidade a fármacos antifúngicos foram documentadas de acordo com as diferentes espécies de *Malassezia*, e isso demanda a determinação exata do agente etiológico. Outro ponto importante de aplicação na clínica médica é o fato de que a forma crônica da pitíriase versicolor está associada a determinada espécie, o que induz à busca de métodos exatos de identificação da espécie.

Relatos de distintas regiões do mundo que utilizam classificação por métodos fisiológicos ou moleculares mostram *M. globosa* como espécie predominante em amostras clínicas, principalmente na pitíriase versicolor e dermatite seborreica. No entanto, *M. furfur* segue com grande importância, e *M. sympodialis* desponta como agente de casos com infecção persistente.

### Exame direto

As escamas epidérmicas, coletadas por raspagem, devem ser enviadas o mais rapidamente possível ao laboratório, pois as células de *Malassezia* se tornam inviáveis em poucos dias. O exame direto da amostra é realizado com uma gota de KOH a 10 a 20% e examinado com alto contraste (condensador baixo) sob aumento de 400 ×. Hifas grossas, curtas e curvas, ladeadas ou não por blastoconídios de parede espessa, redondos, ovais, alongados, com gemulação única, agrupados ou não, permitem o diagnóstico presuntivo de pitíriase versicolor (Figura 32.16).



**Figura 32.16** Complexo *Malassezia* em escamas de pele e em cultura: **A.** Exame direto de escama epidérmica de caso com pitíriase versicolor clarificada com KOH a 20%. Blastoconídios redondos, brotamento único e hifas curvas, característicos de *Malassezia* spp. (400 ×). **B.** Exame de cultura de *Malassezia* spp. com blastoconídios em gemulação única e em base larga. Coloração de Gram (1.000 ×). (Gentileza de Elaine Cristina Corneta.)

### Isolamento em cultura

As espécies patógenas para o homem são lipofílicas e lipídiodependentes e, por isso, requerem ácidos graxos para seu isolamento em meios de cultura a partir de amostras biológicas, como pele ou sangue. A cultura é realizada em meios como Kimmig Ágar (1,9% de glicose, 1,5% de peptona, 0,5 % de glicerina, 0,1% cloreto de sódio, 1,5% de ágar, 1% azeite de oliva, 1% tween 80 e 100 µg/ml de cloranfenicol), meio de Dixon (3,6% extrato de malte, 0,6% peptona, 2% bile de boi, 1,5% de ágar, 1% tween 4 e 0,5% de glicerol) ou, ainda, ágar Sabouraud modificado (acrescido de 1% azeite de oliva e 100 µg/ml de cloranfenicol). A incubação deve ser sob 3 a 37°C em prazo mínimo de 7 dias. A partir de seu isolamento, a identificação pode ser realizada.

### Análise morfológica

Todas as espécies do gênero *Malassezia* exibem morfologia típica e fisiologia características. Todas se reproduzem por brotamento unipolar, com brotos ligados à célula-mãe por base larga, que pode se apresentar sob forma alongada, esférica ou ovoides e desenvolver, ou não, hifas rudimentares. *M. pachydermatis* é caracterizada por células ovoides pequenas (2,0 a 2,5 µm × 4,0 a 4,5 µm); apresentando base larga, esta espécie é a única que cresce em meio sem adição de lipídio. *M. furfur*



é a única espécie que apresenta micromorfologia variável com células cilíndricas (1,5 a 3,0  $\mu\text{m} \times 2,5$  a 8,0  $\mu\text{m}$ ), ovóides ou globosas. Os filamentos podem originar-se em qualquer ponto da levedura. A colônia apresenta textura cremosa, com coloração branca e aspecto seco. *M. sympodialis* apresenta células ovóides pequenas (1,5 a 2,5  $\mu\text{m} \times 2,5$  a 6,0  $\mu\text{m}$ ) e foi diferenciada de *M. furfur* devido ao seu brotamento simpodial. Apresenta colônias brilhantes, lisas e planas. *M. globosa* apresenta células esféricas (2,5 a 8,0  $\mu\text{m}$ ) e estruturas alongadas formando quadro típico de tubo germinativo ou pequenos filamentos. As colônias são rugosas, ásperas e quebradiças. *M. obtusa* tem pequenas células cilíndricas (1,5 a 2,0  $\mu\text{m} \times 4,0$  a 6,0  $\mu\text{m}$ ) e colônias planas e lisas com textura mucoide. *M. restricta* tem células esféricas ou ovóides (1,5 a 2,0  $\mu\text{m} \times 2,5$  a 4,0  $\mu\text{m}$ ) e apresenta elo de junção entre célula-mãe e filha um pouco mais estreito do que as outras espécies. As colônias apresentam-se lisas com textura dura e quebradiça, e esta é a única espécie lipídio-dependente que apresenta reação de catalase negativa. *M. slooffiae* apresenta pequenas células cilíndricas (1,0 a 2,0  $\mu\text{m} \times 1,5$  a 4,0  $\mu\text{m}$ ) e as colônias apresentam-se rugosas e com textura áspera.

### Métodos fisiológicos

A identificação de gênero é realizada por meio da observação da dependência de lipídios e morfologia celular, mas a identificação das espécies não pode ser realizada em base de provas convencionais, como assimilação de fontes de carbono e fermentação de carboidratos. De outro modo, os testes de assimilação são realizados com tween 20, 40, 60 e 80, para ver a habilidade do isolado em assimilar esses polissorbatos sob 32°C durante o período máximo de 7 dias. Todas as espécies, exceto *M. restricta*, apresentam reação de catalase positiva. A prova é realizada misturando-se uma colônia a uma gota de peróxido de hidrogênio em uma lâmina de microscopia. A reação positiva produz bolhas de gás, e a ausência dessa formação indica *M. restricta*. A prova da esculina é realizada para ver atividade de  $\beta$ -glucosidase presente nas diversas espécies de *Malassezia*. A prova é realizada em ágar distribuído em tubo de ensaio, no qual é inoculada a amostra de levedura, seguido de incubação por 5 dias sob a temperatura de 32°C. O escurecimento do meio revela a quebra da molécula de esculina. O teste serve para distinguir *M. furfur*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis* das outras espécies de *Malassezia*.

### Métodos moleculares

Os métodos fenotípicos nem sempre produzem resultados claros e reprodutíveis. Além disso, para algumas espécies têm baixo poder discriminatório. Técnicas como *pulsed-field gel electrophoresis*-PFGE, *randomly amplified polymorphic DNA*-RAPD, *polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis*-PCR-RFLP, *denaturing gradient gel electrophoresis*, *multilocus enzyme electrophoresis*, sequenciamento, análise de sequências ribossômicas e do gene da quitina sintetase foram propostos para realizar a identificação acurada de espécies de *Malassezia*. *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae* podem ser diferenciadas por PCR-RFLP, e foi por essa técnica que as mais novas espécies (*M. dermatis*, *M. nana*, *M. yamatoensis* e *M. japonica*) foram descobertas.

### ■ Tinha negra

A tinha negra (*tinea nigra*) é considerada uma feo-hifomicose e se caracteriza pelo aparecimento de manchas marrons ou negras, planas, úmidas, não descamativas, de contorno

nítido, únicas ou confluentes. As lesões têm bordas bem definidas, porém, forma irregular, e ocorrem com frequência nas palmas das mãos e plantas dos pés, mais raramente no dorso do pé, pescoço e tórax. A doença tem importância pelo comprometimento estético e merece diagnóstico diferencial de melanoma maligno.

A doença tem alta prevalência em áreas tropicais das Américas do Sul e Central, África e Ásia, acometendo indivíduos de idades variadas, com maior incidência em mulheres com menos de 20 anos. Fatores predisponentes são ainda indeterminados.

O agente é um fungo de cor escura, *Hortaea* (*Phaeoanellomyces*, *Exophiala*) *werneckii*, classificado como *yeast-like fungi*, ou seja, fungo semelhante a levedura, porque o aspecto inicial das culturas é leveduriforme e torna-se, posteriormente, aveludado, coureáceo, com o desenvolvimento de micélio aéreo e conídios.

### Exame direto

O exame microscópico das escamas epidérmicas com KOH a 20% revela hifas septadas (1,5 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), ramificadas, de cor marrom-clara ou, com frequência, fragmentos septados sinuosos e curtos, com extremidades hialinas. Blastoconídios ovalados com gemulação unipolar, algumas vezes septados, podem ser encontrados (Figura 32.17A).

Sugestão de resultado de exame direto positivo: hifas septadas, pigmentadas com (ou sem) blastoconídios compatíveis com *Hortaea*.

### Isolamento, cultura e identificação

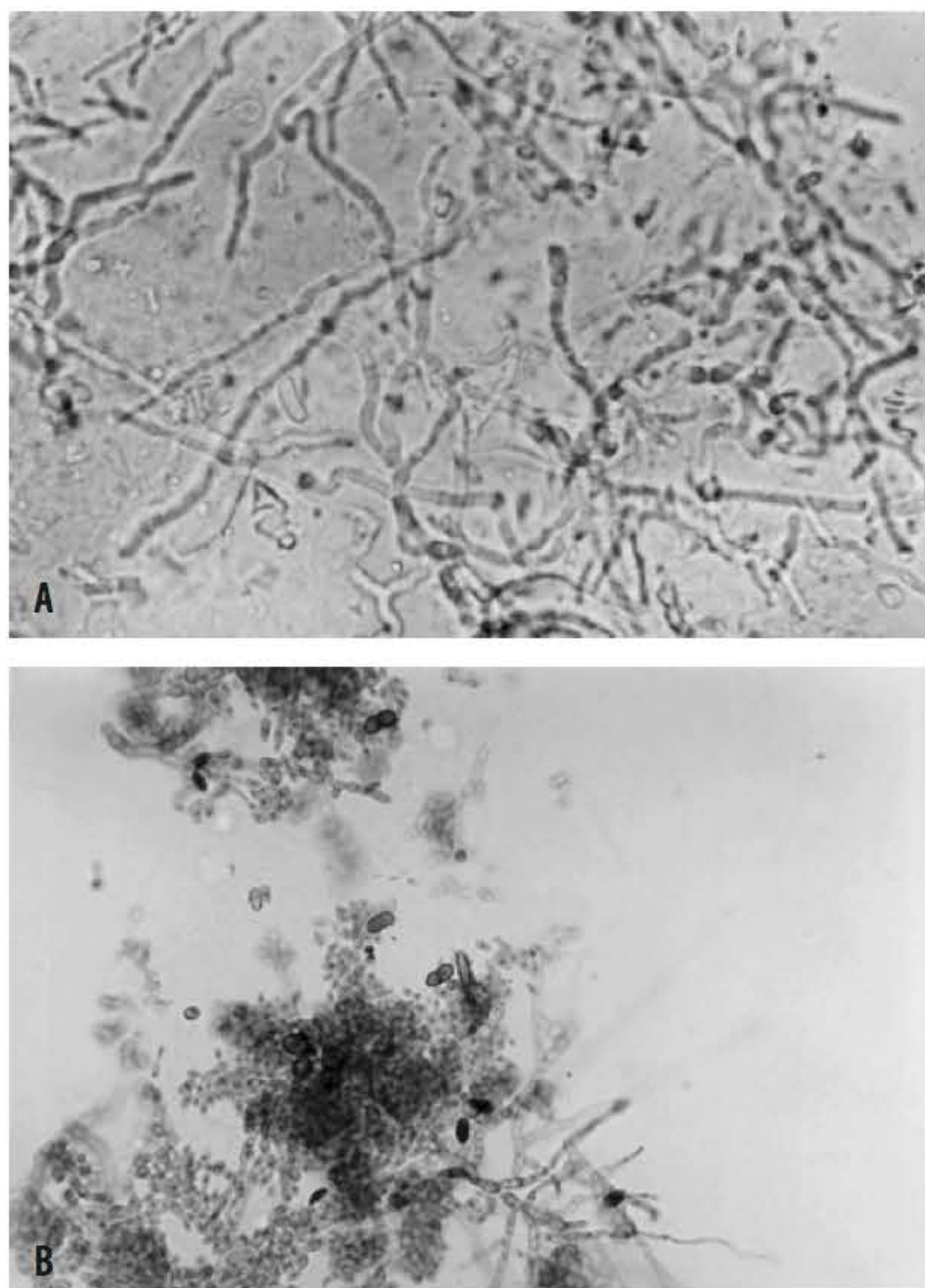
*H. werneckii* é fungo de crescimento lento (2 a 3 semanas), iniciando com colônias de aspecto brilhante e aspecto leveduriforme nas cores verde-olivácea a preto-acinzentada, adquirindo, progressivamente, aspecto filamentoso, velutíneo na cor cinza ou preto-acinzentada.

A observação microscópica das colônias recentes leveduriformes revela células cilíndricas a ovais, unicelulares ou bicelulares, de cor marrom, que se reproduzem por brotamento. As células são arredondadas em um dos lados e achatadas no outro, com anelações (anéis). Com o tempo, as colônias são formadas por hifas estreitas ou largas, septadas e com parede espessa. Ao longo dessas hifas originam-se conídios (aneloconídios hialinos a oliváceos) unicelulares ou bicelulares (Figura 32.17B). Esses aneloconídios tendem a se acumular em círculos em torno das hifas e podem produzir novos conídios por brotamento. O uso de iniciadores específicos Hor-F (5'-TGGACACCTTCATACTCTTG-3') e Hor-R (5'-TCACAACGCTTAGAGACGG-3') pode confirmar isolados de *H. werneckii*.

### ■ Piedra preta

Piedra preta é infecção fúngica que afeta a porção extra-folicular dos pelos do couro cabeludo, barba e bigode e, raramente, pelos axilares e pubianos. A doença é caracterizada pela formação de nódulos irregulares duros, de cor castanho-escura, firmemente aderidos aos pelos. Os cabelos afetados apresentam nódulos visíveis em formação de rosário. A micose é encontrada principalmente em regiões tropicais da África, Ásia e Américas do Sul e Central. Seres humanos e primatas podem ser afetados. A doença foi relatada em ambos os sexos e em idades variadas. Não são conhecidos os fatores predisponentes, embora a umidade seja mencionada como fator desencadeante. A micose é causada por um fungo demácio





**Figura 32.17** Exame direto de escamas de tinha negra. **A.** Presença de hifas septadas demácias em KOH (400 x). **B.** Conídios uni ou bicelulares de *P. werneckii* (400 x).

pertencente aos ascomicetos denominado *Piedraia hortae*. O nódulo constitui-se de um aglomerado firme de várias estruturas de reprodução sexuada denominado ascocarpo, de tipo ascostroma, contendo ascos e ascósporos.

### Exame direto

Fragmentos de pelos contendo nódulos são preparados em KOH a 20%, aquecidos gentil e cuidadosamente, comprimidos com lamínula. Os nódulos são resistentes à pressão e podem ou não ser descompactados por esse procedimento. Ao microscópio, visualiza-se um nódulo escuro de consistência firme, formado por estroma de células romboides e parede espessa, semelhantes a artroconídios. De maneira intercalar, podem-se observar lóculos (regiões mais claras) onde se encontram ascos e ascósporos (Figura 32.18). Com clarificação adequada, podem-se distinguir ascos redondos a ovais contendo ascósporos em seu interior. Os ascósporos são fusiformes (escolecosporos), curvados, hialinos, com um ou mais apêndices. Na prática, o resultado do exame direto do pelo é conclusivo ante apenas a visualização de nódulo escuro com consistência firme.

Sugestão de resultado do exame direto positivo: presença de nódulos de *Piedraia hortae* (pedra preta).

### Isolamento, cultura e identificação

Para o isolamento do agente etiológico, pode-se usar ágar Sabouraud-dextrose-cloranfenicol. A cultura a 25°C tem crescimento lento (10 a 15 dias), é aderente ao meio de cultura, tem cor marrom-escuro a preta e forma cônica. O centro da colônia é elevado e cerebriforme, e a periferia é plana. Um



**Figura 32.18** Nódulo de pedra preta em KOH (400 x).

micélio aéreo curto de cor marrom-esverdeada geralmente cobre a colônia glabrosa. Pigmento de cor ferrugem pode ser observado no meio da cultura. Ao microscópio, observam-se hifas septadas, de cor escura, parede grossa, clamidoconídios intercalares e células irregulares tumefeitas; conídios e ascósporos não são encontrados em meios de rotina micológica.

### ▪ Piedra branca

Piedra branca é infecção fúngica que afeta a porção extra-folicular dos pelos, frequentemente, axilares e pubianos. A doença caracteriza-se pela presença de nódulos de cor bege-clara a marrom-clara. A infecção pode se iniciar abaixo da cutícula do pelo com o crescimento do fungo formando pequena aglomeração de hifas unidas e fragmentando-se em artroconídios. Essas formações têm forma de nódulo e se localizam ao longo do eixo ou então ao redor do pelo. Os nódulos de pedra branca, ao contrário dos de pedra preta, podem ser comprimidos e separados do pelo com facilidade.

A infecção ocorre esporadicamente na América do Norte e Europa, mas é mais frequente na América do Sul e no Oriente. Embora rara, a localização em pelos da região genital externa prevalece em determinadas populações. Em nosso país, o maior número de casos tem sido descrito no sexo masculino, diferindo dos achados em outros países, em que ambos os sexos são afetados igualmente. A doença foi descrita em todas as faixas etárias. Ainda não são conhecidos os fatores predisponentes, porém promiscuidade e infecção pelo HIV constituem fatores desencadeantes da pedra branca.

*Trichosporon* spp. pertence à família Cryptococcaceae. *T. beigeli* é a espécie mais comumente observada no laboratório clínico e é considerado, tradicionalmente, o agente etiológico de pedra branca. Em recentes estudos, verificou-se que *Trichosporon ovoides* e *T. inkin* são frequentemente isolados de casos de pedra branca, sendo o primeiro mais associado aos pelos do couro cabeludo e o segundo aos pelos pubianos. *T. cutaneum* e *T. asteroides* são também isolados, mas em menor frequência, provavelmente como contaminantes.

Doença disseminada devido a *Trichosporon* é rara, mas tem sido descrita em pacientes imunocomprometidos, especialmente granulocitopênicos; é frequentemente fatal e refratária a tratamento com anfotericina B. *T. beigeli*, *T. asahii* e, mais raramente, *T. mucoides* são espécies envolvidas em infecções graves e disseminadas em pacientes suscetíveis (ver Tricosporonose).



O diagnóstico diferencial de piedra branca deve ser realizado em relação à pediculose, desde que os nódulos assemelham-se a lêndeas e piolhos. A infecção bacteriana dos pelos, tricomiose axilar, também merece ser considerada no diagnóstico diferencial.

### Exame direto

Pelos axilares, pubianos, ciliares e cabelos infectados que apresentem nódulos de cor creme ou acinzentados são esmagados entre lâmina e lamínula, com KOH a 10% ou NaOH 25 a 50% com glicerina. Ao microscópio, são observadas hifas septadas hialinas, segmentando-se em células ovais a retangulares (artroconídios), com 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Blastoconídios podem ser, eventualmente, visualizados (Figura 32.19).

Sugestão de resultado do exame direto positivo: presença de nódulos característicos de piedra branca.

### Isolamento, cultura e identificação

O agente etiológico é facilmente isolado em ágar Sabouraud com cloranfenicol. O meio não deve conter cicloeximida, pois esta substância inibe a maioria das espécies. O crescimento é rápido, produzindo colônias leveduriformes brancas a creme, com morfologia variável conforme a espécie.

Ao exame microscópico da cultura, verificam-se pseudo-hifas e hifas verdadeiras septadas, hialinas, que se transformam em artroconídios ovais ou retangulares ao lado de blastoconídios de várias formas. Os isolados de *Trichosporon* podem produzir poucos blastoconídios, o que dificulta a diferenciação de *Geotrichum*. Para aumentar a produção de blastoconídios, o isolado é semeado em caldo de extrato de malte à temperatura ambiente por 48 a 72 h. Em meio sólido, as colônias aparecem após 1 semana, apresentando-se inicialmente de cor creme,

lisa e brilhante, e tornando-se mais tarde secas, membranosas e cerebriformes.

*T. beigeli* não fermenta carboidratos; assimila dextrose, D-xilose e inositol, mas não assimila nitrato. Produz urease e dá reação positiva com azul de diazônio B (DBB). O gênero *Trichosporon* é relacionado com a classe dos basidiomicetos por apresentar, em suas hifas, dolíporos e parentossomos típicos da classe.

### ■ Eritrasma e tricomiose nodular

Embora sejam infecções produzidas por bactérias, o eritrasma e a tricomiose nodular são tradicionalmente citados nos textos de micologia por apresentarem similaridade com algumas micoses superficiais.

O eritrasma é uma infecção localizada no estrato córneo da pele e se caracteriza por placas planas, secas, lisas e uniformes, de cor rubro-avermelhada. A localização topográfica mais comum é a inguinocrural e os espaços interdigitais, e a menos frequente é nas axilas e dobras submamárias.

As lesões fluorescem sob luz UV de Wood e apresentam cor vermelho-coral característica. O agente etiológico é um actinomiceto, *Corynebacterium minutissimum*, em forma de filamentos longos, cocoides e bacilares com 1 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

A tricomiose nodular é infecção que envolve pelos axilares e genitália. O agente causal forma concreções ao longo dos pelos e adquire diferentes colorações de acordo com sua associação a bactérias cromogênicas. O agente etiológico, *Corynebacterium tenuis*, desenvolve-se como massa mucilaginosa em que se observam formas cocoides e bacilares (aumento de 1.000  $\times$ ). Distingue-se dos outros agentes etiológicos já descritos pelo aspecto microscópico, pois seus filamentos têm cerca de 1  $\mu\text{m}$ , enquanto hifas de leveduras têm de 2 a 4  $\mu\text{m}$ .

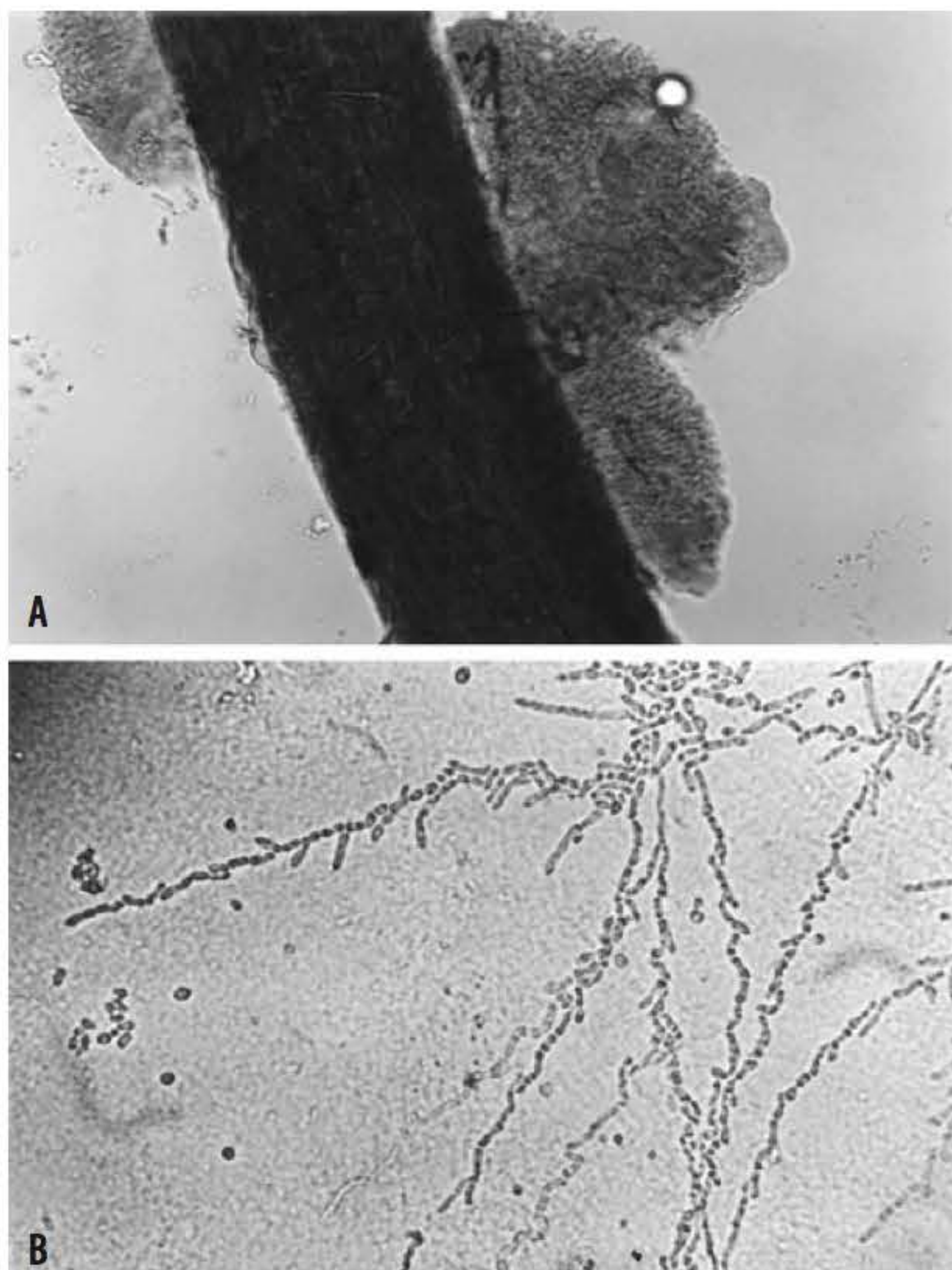
## ► Micoses cutâneas

As micoses cutâneas incluem uma grande variedade de doenças em que pele, pelos e unhas estão envolvidos. A infecção é, em geral, restrita às camadas corneificadas, podendo ocorrer, no entanto, variedade de alterações patológicas no hospedeiro devido à sua suscetibilidade, tipo de agente infeccioso e respectivos produtos metabólicos.

A maioria das micoses cutâneas é causada por um grupo homogêneo de fungos queratinofílicos chamados dermatófitos e, por isso, denominam-se dermatofitoses. Além desses, outros fungos podem estar envolvidos em infecções cutâneas e, neste caso, as infecções são conhecidas como dermatomicoses. Vários agentes etiológicos são descritos nesta entidade clínica. Atualmente, a incidência de dermatomicose por fungos não dermatófitos tem aumentado consideravelmente. Estes fungos são sapróbios, e o contato com eles faz-se por meio de solo e plantas. Estes fungos não são queratinofílicos, mas utilizam a queratina denaturada. Entre estes, pode-se citar *Candida* sp., *Scytalidium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Scopulariopsis* sp. e outros.

### ■ Dermatofitoses

As dermatofitoses, classicamente denominadas *tinea* (ou *tinha*), são infecções fúngicas dos tecidos queratinizados –



**Figura 32.19** Nódulo de piedra branca. **A.** KOH (400  $\times$ ). **B.** *Trichosporon* sp. em exame direto (400  $\times$ ).



pelos, unhas e pele – do ser humano e de outros animais, causadas por dermatófitos.

Os agentes etiológicos das dermatofitoses são classificados em três gêneros anamórficos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Os dermatófitos capazes de se reproduzir na forma sexuada são classificados no gênero *Arthroderma*, família *Arthrodermataceae* das *Onygenales*, subdivisão *Ascomycotina*.

A infecção é essencialmente cutânea; os dermatófitos não penetram nas partes mais profundas dos tecidos ou órgãos. A manifestação pode ser leve ou grave, em consequência da reação do hospedeiro e de produtos metabólicos do fungo, além da virulência da cepa, localização da infecção e fatores predisponentes. O tecido subcutâneo pode ser invadido ocasionalmente, o que resulta em granuloma de Majocchi, Querion ou, mais raramente, infecção generalizada.

Os dermatófitos têm em comum a habilidade de digerir queratina, a escleroproteína insolúvel da camada cutânea. São tolerantes à cicloeximida e têm habilidade para alcalinizar o meio em presença de glicose e peptona.

A distribuição geográfica das espécies de dermatófitos é muito variada; algumas, como *Trichophyton rubrum*, são cosmopolitas, encontradas no mundo inteiro, enquanto outras são mais restritas, como *T. concentricum*, limitada às ilhas do Pacífico e regiões das Américas Central e do Sul.

A via de transmissão das dermatofitoses pode ser direta ou indireta, por objetos contaminados. As fontes de infecção são:

- Animais, para espécies zoofílicas
- Solo, espécies geofílicas
- Homem, espécies antropofílicas.

Acredita-se que as estruturas fúngicas responsáveis pelo contágio, especialmente em dermatófitos antropofílicos, são esporos de forma oblonga a arredondada, denominados artroconídios, que são visualizados em cabelos e escamas epidérmicas infectados. Essas estruturas podem persistir viáveis durante anos no meio ambiente e são altamente resistentes ao calor. A maioria dos estudos mostra que 2/3 das espécies de dermatófitos associadas à doença em seres humanos são antropofílicas. Várias espécies antropofílicas têm áreas bem definidas de endemicidade, enquanto outras, como *T. rubrum* e *T. tonsurans*, são cosmopolitas.

O reconhecimento do gênero e espécie de dermatófito é clinicamente relevante e é primordial para estudos epidemiológicos. A identificação acurada do agente é indicada nos casos que:

- Têm animal como fonte de contágio
- São oriundos de população geograficamente limitada, tais como instituições ou grupos de familiares
- Os agentes podem causar surtos epidêmicos
- São provenientes de áreas endêmicas, refletindo exposição durante viagem ou residência.

As dermatofitoses, na clínica médica, recebem o nome da localização topográfica da doença, conjugada à palavra “tinha” ou ainda, em latim, *tinea*. Assim, *tinea capitis*, *tinea manum*, *tinea pedis* etc. No Quadro 32.13 são apresentadas as principais dermatofitoses, respectivos sítios topográficos e agentes etiológicos mais frequentes.

Pacientes com suspeita de tinha do couro cabeludo devem ser examinados, preferentemente, em sala escura sob lâmpada de Wood (lâmpada de UV) para verificação da presença de cabelos fluorescentes na cor verde brilhante. Essa fluorescência é típica de infecção do tipo ectótrico (lado externo do cabelo),

**Quadro 32.13 - Principais dermatofitoses, sítios topográficos e respectivas áreas de localização da doença e agentes etiológicos.**

Dermatofitose	Localização	Espécies mais frequentes
<i>Tinea manum</i>	Mãos	<i>T. mentagrophytes</i>
<i>Tinea pedis</i>	Pés e dedos	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i>
<i>Tinea corporis</i>	Tronco, ombro, membros e face	Várias espécies
<i>Tinea unguium</i>	Unha	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>
<i>Tinea barbae</i>	Área da barba	<i>T. verrucosum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>
<i>Tinea capitis</i>	Couro cabeludo	<i>T. tonsurans</i> , <i>M. canis</i>
<i>Tinea cruris</i>	Virilha, púbis e área perineal	<i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>

e é, em geral, causada por *M. canis*, *M. audouinii* e *M. ferrugineum*. Cabelos infectados com *T. schoenleinii* podem mostrar cor verde-clara. A lâmpada de Wood pode também auxiliar na diferenciação de outras infecções clinicamente similares à tinha do corpo ou inguinocrural, como o eritrasma. No eritrasma a pele fluoresce na cor laranja a vermelho-coral, enquanto na última a pele não fluoresce.

### Diagnóstico laboratorial

O exame direto dos pelos, unhas e escamas de pele obtidas por raspagem é método rápido e sensível para o diagnóstico de dermatofitose. A coleta deve ser feita nas áreas mais externas das lesões. Escamas, raspados subungueais, fragmentos de unhas, pelos, cabelos opacos, quebradiços e curtos ou com aspecto de pontos negros são os espécimes clínicos mais adequados para isolamento e identificação de dermatófitos. A borda das lesões oferece material rico para exame micológico. O crescimento dos dermatófitos no tecido cutâneo do hospedeiro ocorre de forma radial, de modo que o centro das lesões consiste em um material que contém fungos degenerados e inviáveis.

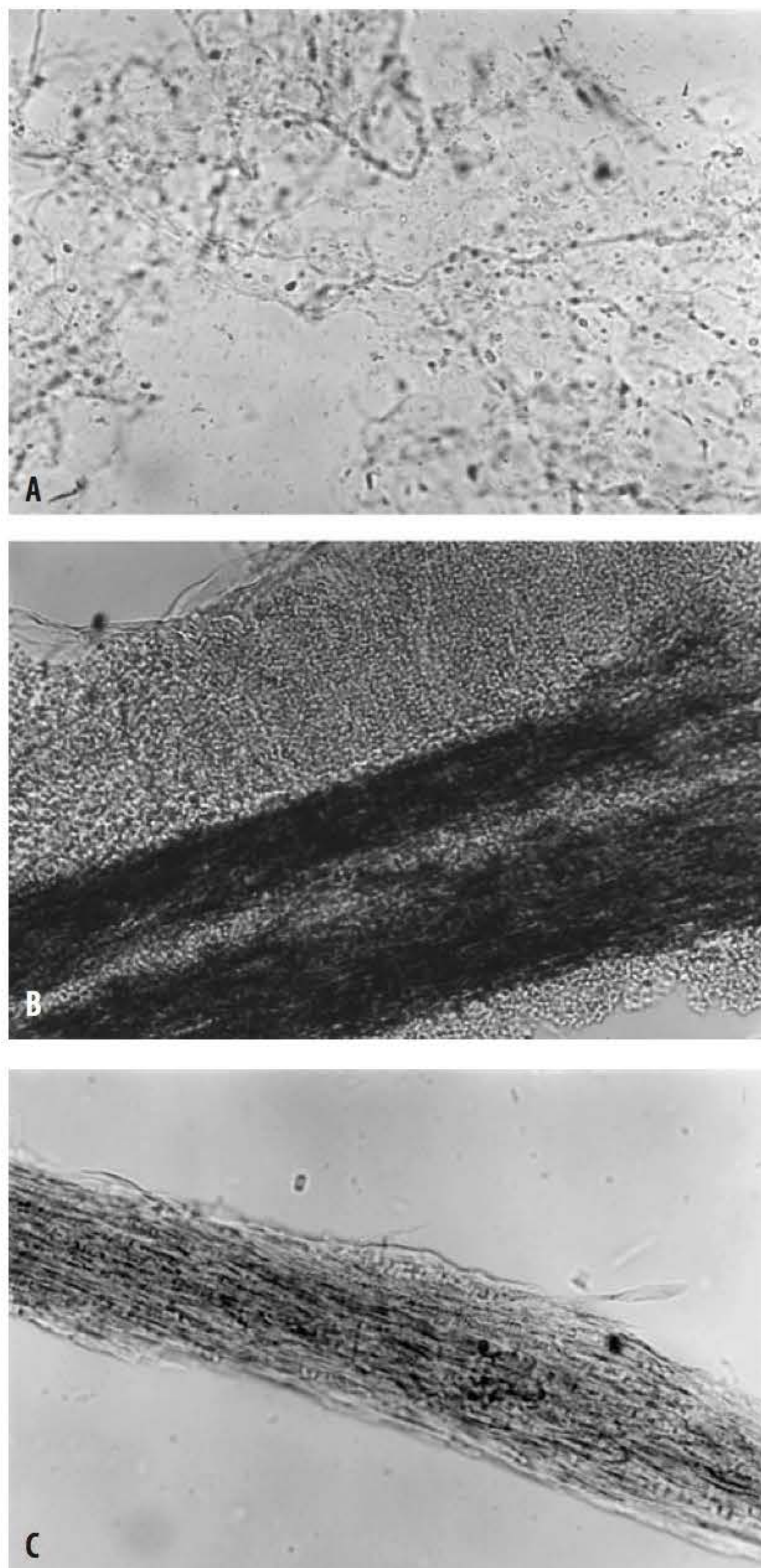
### Exame microscópico direto

O exame microscópico direto é um método diagnóstico muito bom, ainda que resultados falso-negativos ocorram na ordem de 5 a 15%. A causa dessa margem de erro é diversa: escassez de material, material inadequado (escamas de centro de lesão, cabelos íntegros, pedaços de unha), tratamento tópico ou sistêmico, uso de pomadas ou clarificação insuficiente. A coleta e a técnica de preparação devem seguir estritamente o protocolo previsto. É necessário que o laboratorista seja experiente na realização deste exame, pois existem muitos artefatos passíveis de serem confundidos com hifas ou esporos de dermatófitos (artroconídios).

Para o exame direto, escamas de pele obtidas por raspagem com bisturi ou cabelos e pelos tonsurados são colocados sobre 1 a 2 gotas de KOH (10 a 20%) e aquecidos levemente para acelerar o processo de digestão do material. As estruturas fúngicas são observadas com aumento de 100 e 400 ×. Outras formulações indicadas são KOH a 20% + dimetil sulfoxido, KOH + tinta Parker, calcoflúor branco ou técnica de vermelho congo.

No caso de tinha do corpo, dos pés, das unhas (onicomicose), das mãos, da barba e inguinocrural, hifas hialinas de 3 a 15 µm de diâmetro, septadas, ramificadas, com ou sem artroconídios, são observadas ao exame direto (Figura 32.20). Três tipos de parasitismo podem ser verificados nos cabelos e/ou pelos de casos de tinha do couro cabeludo ou da barba: ectótrico, endótrico e fávico





**Figura 32.20** Dermatofitos em vida parasitária: **A.** Hifas hialinas septadas (KOH 400 x). **B.** Pelos, parasitismo ectótrico. **C.** Pelos, parasitismo endótrico.

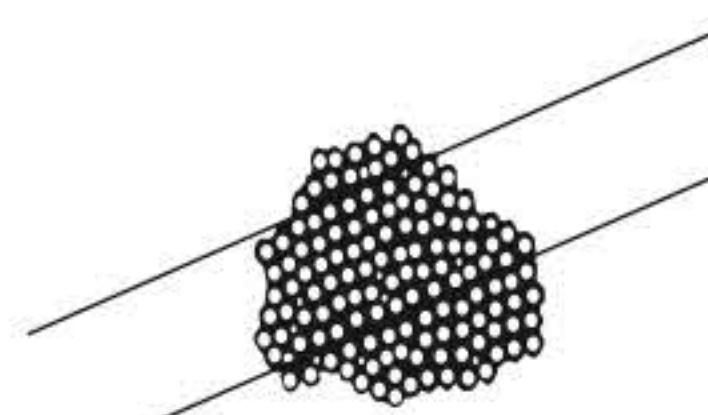
(Figura 32.20). Na Figura 32.21 estão esquematizados aspectos microscópicos dessas afecções.

#### Interpretação do exame direto positivo

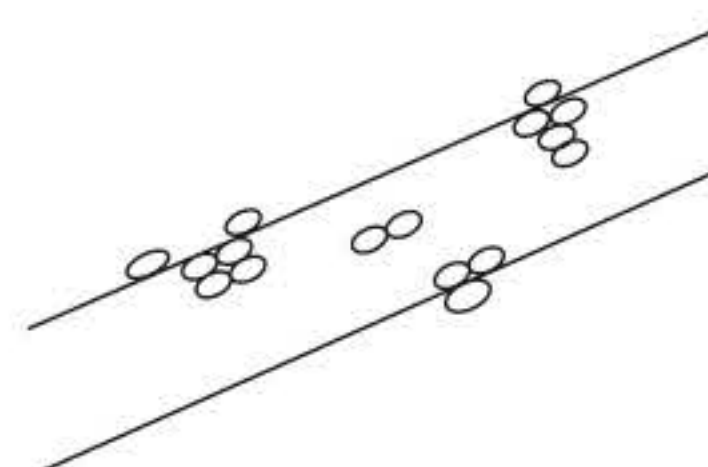
Em lesões que comprometem o cabelo, chega-se ao diagnóstico clínico de tinea do couro cabeludo de variedade endótrica, endoectótrica (mista) ou fávica.

Na pele glabra, o diagnóstico é tinea do corpo. Se as lesões se localizarem nos pés ou nas mãos o diagnóstico é, respectivamente, tinea do pé e tinea da mão. Nas áreas inguinocrural, interdigital e submamária a infecção pode não ser causada por dermatófito, mas por espécies de *Candida*, e o diagnóstico diferencial pode ser difícil quando apenas hifas são visualizadas, sem a presença de blastoconídios que caracterizem a presença de leveduras ou artroconídios para dermatofitos. As hifas de dermatofitos, em regra, são mais longas, finas e simétricas que

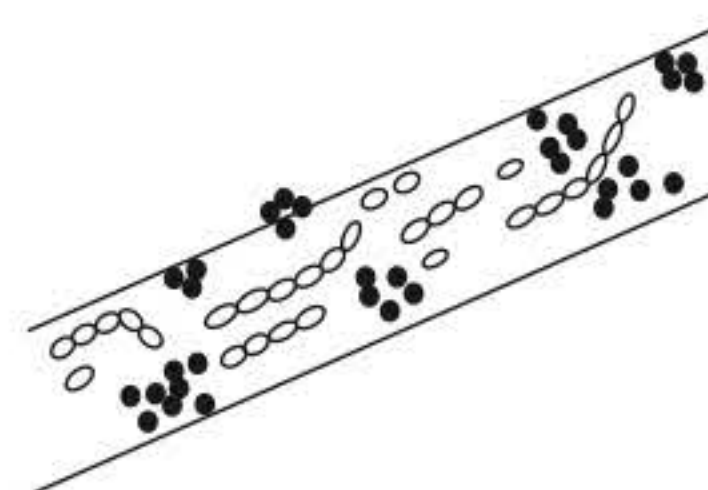
#### Parasitismo tipo ectótrico



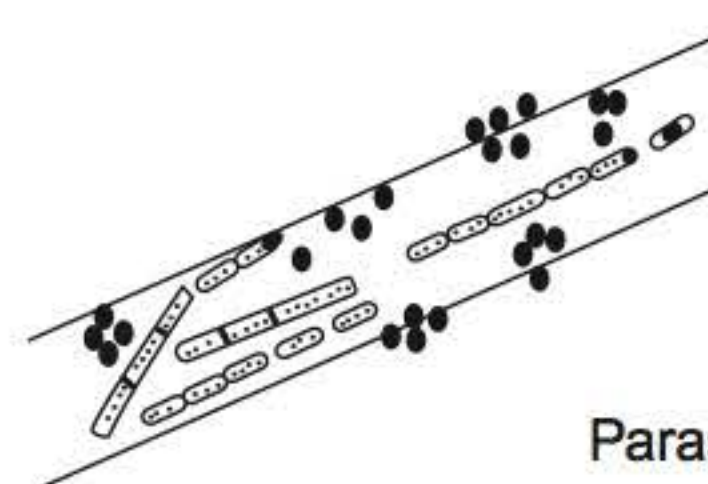
1. Artroconídios (1 a 3  $\mu\text{m}$ ) aparecem como um mosaico ao redor do cabelo. Agentes etiológicos mais comuns: *M. canis*, *M. audouinii* ou *M. ferrugineum*. Cabelos infectados fluorescem sob a lâmpada de Wood.



2. Poucos artroconídios (3 a 4  $\mu\text{m}$ ) espalhados ao redor do cabelo são sugestivos de infecção por *M. gypseum* e *M. fulvum*. Cabelos não fluorescem sob a lâmpada de Wood.

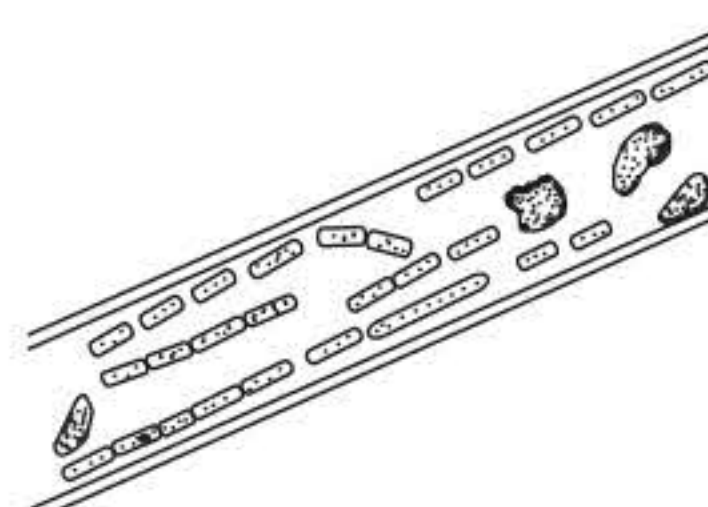


3. A formação de esporos pode ser menos exuberante, formando-se poucas cadeias de artroconídios (3 a 4  $\mu\text{m}$ ). *T. mentagrophytes* é o agente envolvido neste tipo de parasitismo. Cabelos não fluorescem sob a lâmpada de Wood.

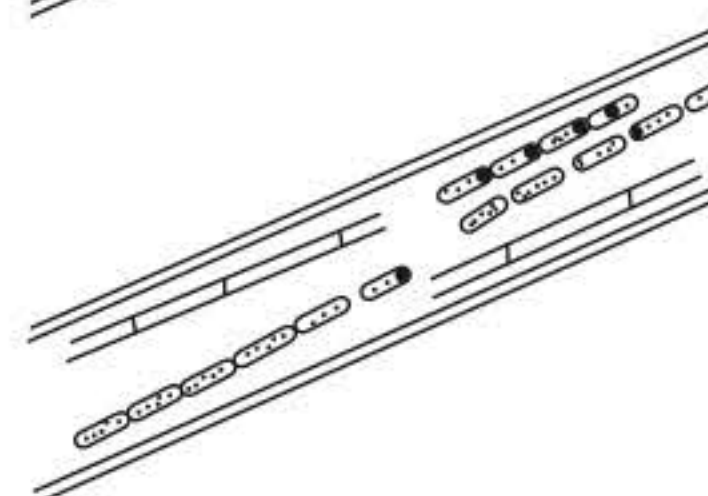


4. Muito semelhante ao parasitismo anterior, diferindo apenas no tamanho dos artroconídios (8 a 12  $\mu\text{m}$ ). *T. verrucosum* é o agente deste tipo de infecção. Cabelos fluorescem sob a lâmpada de Wood.

#### Parasitismo tipo endótrico



5. Presença de hifas, de "bolhas de ar" ou túneis, gotas de gordura no pelo parasitado. As bolhas de ar aparecem devido a processo de ceratólise. Estas são sinal indiscutível de parasitismo por *T. schoenleinii*, o agente causal da *tinea favosa*.



6. Hifas e cadeias de artroconídios (3 a 4  $\mu\text{m}$ ) podem coexistir dentro do pelo. *T. tonsurans* e *T. violaceum* são os principais agentes envolvidos.

**Figura 32.21** Descrição e representação esquemática dos principais tipos de parasitismo em pelos.

as de leveduras. Nas lesões de unhas e pés, são frequentes apenas hifas de cor hialina, de modo que o diagnóstico diferencial também é difícil.

Para todos os casos de dermatofitoses, é necessário o cultivo para identificar o agente etiológico em gênero e espécie.

#### Resultados de exame direto positivo

- Pele glabra: há fragmentos de micélio compatíveis com dermatofitos
- Escamas da região inguinocrural, unhas e pés: há fragmentos de micélio (ou pseudomicélio). Em caso de presença de artroconídios ou hifas características: positivo para dermatofitos



- Cabelo ou pelo: invasão de tipo endótrico ou tipo ectótrico ou, ainda, de tipo fávico.

### Isolamento, cultura e identificação

A cultura é complementar ao exame microscópico direto, pois permite a correta identificação do agente etiológico. A identificação é essencial em casos graves, especialmente infecções de unhas e outros que necessitem tratamento com antifúngicos sistêmicos.

Um meio de cultura bastante recomendado é o ágar Sabouraud-dextrose-cloranfenicol-cicloeximida. Recomenda-se, porém, sempre usar em paralelo o ágar Sabouraud-dextrose-cloranfenicol para isolar fungos não dermatofíticos, especialmente *Candida não albicans*.

Estes fungos são inibidos diante de cicloeximida, e, sendo agentes causais de micoses cutâneas, podem ser inativados inadvertidamente, o que leva a resultados falso-negativos de cultura.

O meio DTM (*dermatophyte test medium*) está disponível no mercado internacional e permite verificar a alcalinização do meio, com mudança da cor amarela para a cor vermelha devido ao indicador vermelho fenol, indicando crescimento de cultura de dermatófito. Este meio tem alguns inconvenientes, pois mesmo fungos não patogênicos e não dermatofitos induzem a mudança da cor. Outra desvantagem é que a cor conferida ao meio pela alteração de pH impede a análise macroscópica da pigmentação característica que a maioria das culturas de dermatofitos apresenta.

A adição de gentamicina é recomendada para amostras muito contaminadas, oriundas de lesões com infecção bacteriana secundária. Ágar Sabouraud com cicloeximida, cloranfenicol e gentamicina é rotineiramente usado em alguns

laboratórios junto com o ágar enriquecido casamino ácido-eritritol-albumina para semeadura de unha e pele.


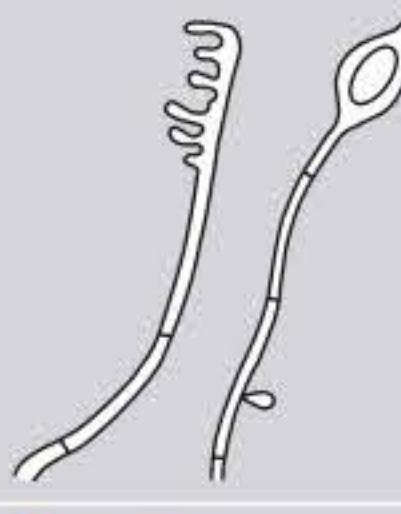
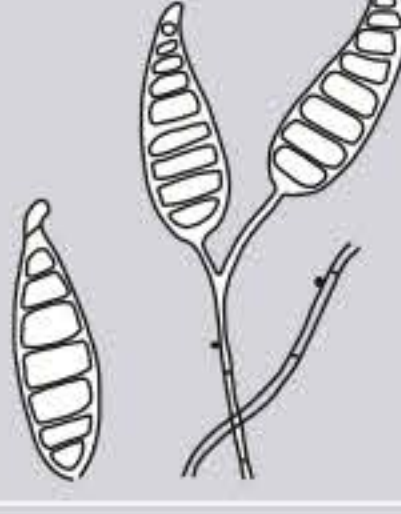
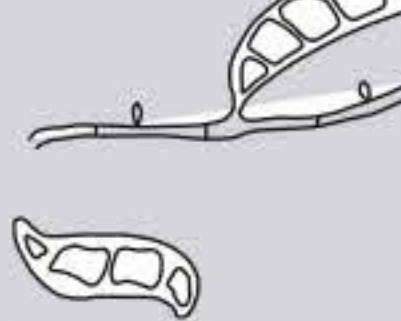
Outro meio de isolamento é o ágar-extrato de levedura-caseína-púrpura de bromocresol, indicado para o rápido reconhecimento de microcolônias de *T. verrucosum*. Esta espécie produz protease que hidrolisa a caseína do meio, levando ao surgimento de zonas opacas ao redor das colônias. Culturas de dermatofitos, em geral, são mantidas em temperatura entre 25°C e 30°C e examinadas semanalmente por períodos máximos de 4 semanas, mas culturas suspeitas de *T. verrucosum* devem ser incubadas a 37°C, temperatura que estimula o crescimento da espécie.

A velocidade de crescimento dos dermatofitos é variável, dependendo do gênero e da espécie. Dos organismos mais frequentes em lesões humanas, *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* formam colônias maduras em períodos que variam de 6 a 10 dias; *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum* e *T. violaceum*, entre 11 e 21 dias.

Isolados de dermatofitos com aspectos típicos podem ser identificados diretamente em meios de isolamento primário. Porém, a ausência de esporulação, muitas vezes, requer meios como ágar-dextrose-batata para estimular a produção de esporos capazes de permitir identificação de gênero.

Dois tipos de conídios hialinos podem ser produzidos pelos dermatofitos: macroconídios multicelulares, lisos ou rugosos, com parede fina ou espessa, e microconídios unicelulares com parede lisa. Os três gêneros são classificados de acordo com a presença ou ausência desses dois tipos de conídios e aparência do macroconídio. A identificação das espécies é fundamentada na morfologia macroscópica e microscópica, arranjo dos conídios e testes fisiológicos (Quadro 32.14).

**Quadro 32.14 • Características das principais espécies de *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*.**

	Morfologia colonial	Morfologia microscópica	Comentários
 <i>E. floccosum</i>	Colônia verde amarelada, plana ou com dobras, pulverulenta a aveludada; verso amarelo-marrom. Tufos brancos são comuns na superfície de culturas velhas; crescimento lento	Macroconídios abundantes, parede lisa, clavados, 0 a 4 septos, clamidoconídios em culturas velhas, microconídios ausentes	Invade pele e unhas; não invade cabelo
 <i>M. audouinii</i>	Colônia branco-acinzentada, creme a marrom-clara; plana; aveludada; verso rosa-salmão a marrom-avermelhado; crescimento com velocidade moderada	Geralmente não forma conídios; apenas clamidoconídios apiculados e terminais; hifas pectinadas podem estar presentes	Causa tinea <i>capitis</i> e <i>corporis</i> ; pigmento marrom em grãos de arroz; algumas cepas esporulam por macroconídios fusiformes com poucos septos; não perfura cabelo <i>in vitro</i>
 <i>M. canis</i>	Colônia branca a camurça, verso de cor amarelo-alaranjado; cotonosa; crescimento rápido	Macroconídios fusiformes, numerosos de parede espessa, rugosa até 15 septos, com ponta terminal abrupta, poucos microconídios	Apresenta bom crescimento e esporulação em grãos de arroz; perfura cabelo <i>in vitro</i>
 <i>M. canis var. distortum</i>	Colônia branca a camurça; geralmente com sulcos radiais; reverso incolor a amarelado; crescimento rápido	Macroconídios distorcidos e bizarros; microconídios abundantes	—

continua



**Quadro 32.14 • Características das principais espécies de *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (continuação).**

	Morfologia colonial	Morfologia microscópica	Comentários
<b>Complexo</b> <i>M. gypseum</i> ( <i>M. gypseum</i> , <i>M. fulvum</i> e <i>M. boullardii</i> ) 	Colônia de cor acamurçada, bordos esbranquiçados; achatada; pulverulenta, granular a flocosa; verso acamurçado a vermelho-marrom; crescimento rápido	Abundantes macroconídios; elipsoides a fusiformes; acima de 6 septos; parede fina; microconídios abundantes	Forma teleomorfa define a espécie
<i>M. equinum</i>	Colônia esbranquiçada a salmão, enrugada, velutínea a pulverulenta; verso acamurçado a salmão	Macroconídios raros, elípticos a fusiformes, 2 a 4 células; parede espessa; semelhante a <i>M. canis</i>	Macroconídio estimulado em ágar niger; não perfura pelo <i>in vitro</i> ; crescimento em grãos de arroz lembrando <i>M. audouinii</i>
<i>M. gallinae</i> 	Colônia branca, tons de rosea levemente enrugada, penugenta, avermelhada, pigmento difusível no anverso; crescimento rápido a moderado	Macroconídio abundante, com finais grosseiros; 2-10 células; paredes geralmente lisas; algumas vezes equinuladas; microconídio piriforme	Conídios estimulados por extrato de levedura ou tiamina
<i>M. nanum</i> 	Colônia de cor creme a acamurçada; pulverulenta, reverso marrom-avermelhado, crescimento moderado	Macroconídios ovalados, bicelular, microconídios poucos a moderados	Crescimento mais lento do que membros do complexo <i>M. gypseum</i> ; deve ser diferenciado de <i>Trichothecium roseum</i>
<i>T. mentagrophytes</i> 	Colônia de cor creme, marrom-clara ou rósea, plana pulverulenta a granular ou penugenta, anverso marrom-claro, amarelado, vermelho ou vermelho-amarronzado; algumas vezes produz pigmento melanoide	Micronídios redondos a piriformes em cachos ou isolados ao longo de hifas; macroconídios clavados presentes em algumas copas; hifas em espiral	Urease positiva; perfura cabelo <i>in vitro</i> , crescimento a 37°C; cresce profusamente em meio leite-púrpura de bromocresol, alcalinizando-o em 7 dias
<i>T. rubrum</i> 	Colônia branca, aveludada, às vezes pulverulenta; verso vermelho-sangue, ou amarelo, laranja ou pigmento melanoide difusível	Micronídio piriforme, geralmente ao longo de hifas não ramificadas; macroconídios ausentes a raros, finos, longos, cilíndricos a clavados em culturas granulares	Teste de urease negativo; perfuração de cabelo <i>in vitro</i> negativa; produção de pigmento em ágar batata, ágar fubá, exceto variantes hialinas ou amarelas
<i>T. schoenleinii</i> 	Branca a castanha; glabra ou cérea tornando-se velutínea em subcultivos; verso sem pigmento; crescimento lento	Micro e macroconídios raros; clamidoconídios frequentemente numerosos; hifas terminais em forma de "candelabros fávicos"	Autotrófica para vitaminas, diferenciando-o de <i>T. verrucosum</i>
<i>T. tonsurans</i> 	Colônia de cor variada (amarela, creme, branca, marrom, cinza); elevada; plana; aveludada ou pulverulenta; anverso marrom-avermelhado; crescimento lento	Microconídio alongado, clavado ou formando estruturas aumentadas em forma de balão; macroconídios raros	Crescimento estimulado por tiamina
<i>T. verrucosum</i> 	Colônia de cor creme a castanha; plana e velutínea (var. <i>discoidea</i> ); branca; crescimento restrito e enrugada; glabra a penugenta (var. <i>ochraceum</i> ); crescimento lento	Macro e microconídios geralmente ausentes; numerosos clamidoconídios em cadeias; macroconídios alongados	Requerem tiamina para crescimento e inositol; crescimento estimulado a 37°C; hidrólise do meio caseína-extrato de levedura-púrpura de bromocresol
<i>T. violaceum</i> 	Colônias pequenas de cor violeta; glabra ou velutínea; reverso púrpura; crescimento lento	Macro e microconídios geralmente ausentes; clamidoconídios eventuais	Crescimento e esporulação estimulados por tiamina



Na identificação de dermatófitos (Weitzman e Summerbell, 1995) devem ser observadas características da colônia, como cor (superfície e anverso), textura (pulverulenta, granular, cotonosa, algodonosa, aveludada ou glabrosa); topografia (elevações, margens, dobras etc.) e velocidade de crescimento.

A morfologia microscópica deve ser observada, principalmente em relação ao tipo (macroconídios e microconídios), quantidade e arranjo de conídios, além de outras estruturas. O estudo micromorfológico pode ser realizado com lactofenol-azul-algodão adicionado a uma pequena porção da cultura ou, ainda, pelo microcultivo realizado em bloco de ágar (1 × 1 cm), montado sobre lâmina de microscopia e examinado com o mesmo corante.

### Identificação dos dermatófitos

Dermatófitos caracterizam-se por:

- Examinar cor da superfície e anverso da colônia, topografia, textura e velocidade de crescimento
- Preparar lâminas para observação da morfologia microscópica: presença e arranjo de macroconídios e microconídios, presença de hifas em espiral, hifas pectinadas e corpos nodulares
- Realizar cultivo em lâmina se a observação anterior não for suficiente. Meios especiais de esporulação: ágar batata-dextrose, ágar Sabouraud-glicose adicionado de 3 a 5% de NaCl ou ágar lactrimel
- Usar testes fisiológicos listados a seguir, se necessário:
  - Teste da produção de urease para *T. rubrum* e alguns isolados de *T. soudanense*
  - Requerimento nutricional: para espécies de *Trichophyton*
  - Crescimento em grãos de arroz: para espécies de *Microsporum* (*M. audouinii*), cresce muito pouco e produz pigmento marrom, enquanto *M. canis* cresce bem e secreta pigmento amarelo)
  - Perfuração do cabelo *in vitro* para diferenciar isolados atípicos de *T. mentagrophytes* e atípicos de *T. rubrum*
  - Teste de tolerância à temperatura e/ou temperatura ótima de crescimento
  - Meios com formulação especial para diferenciar *T. mentagrophytes* de *M. persicolor*, *T. rubrum* de *T. mentagrophytes* e *T. soudanense* de *M. ferrugineum*.

### Métodos moleculares aplicados para dermatófitos

A maioria dos estudos que discutem o uso de ferramentas moleculares para o diagnóstico foca diferentes técnicas de PCR para discriminar os dermatófitos em cultura, como, por exemplo, a utilização do iniciador arbitrário 5'-ACCCGACCTG-3', que diferencia *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*. Tais métodos podem ser úteis principalmente em isolados atípicos. A eficácia desses métodos foi comprovada com o uso dos iniciadores AC10 e M13, que foram capazes de diferenciar espécies e variedades de *T. mentagrophytes*. Fragmentos do gene CHS1 também identificam espécies de *Trichophyton* sp., incluindo *T. tonsurans* e *T. violaceum*.

O PCR e outros resultantes de modificações deste teste, como PCR *nested*, PCR multiplex, PCR a partir de iniciadores randômicos (RAPD), PCR associado à análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) e PCR em tempo real,

são aplicados para identificar e diferenciar gêneros e espécies de dermatófitos.

A utilização de diferentes métodos moleculares como o PCR *fingerpinting* e análise por AFLP pode identificar espécies de *Trichophyton* spp., discriminando *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*. Tais métodos aplicados em outras espécies também fornecem resultados similares e surpreendentes. Por exemplo, *T. megninii*, *T. soudanense* e *T. yaoundei* foram todos associados a *T. rubrum* ou *T. violaceum* após análise molecular. Esses resultados enfatizam que as ferramentas moleculares podem ser refinadas para simplificar o que parecia ser uma forma complexa de classificação.

O uso de diferentes métodos ou sondas pode também fornecer a separação de subespécies para estudos epidemiológicos de origem geográfica ou em surtos. Nesses casos, dois novos subelementos repetitivos em tandem, TRS-1 e TRS-2, obtidos a partir da região não transcrita do DNA ribossômico (NTS) de *T. rubrum*, já foram usados para identificar variedades e acompanhar recidivas na terapia de onicomicoses. Uma forma ideal de estabelecer um sistema de diagnóstico eficaz com especificidade é por meio da aplicação de identificadores espécie-específicos da região ITS 2.

Regiões ITS têm sido constantemente utilizadas como alvo, e estudos mostram que variações nessas sequências podem identificar *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. GACA4 pode identificar espécies de *M. canis* e *E. floccosum* e cepas de *T. mentagrophytes*, produzindo três diferentes perfis genéticos. Outros alvos para a identificação incluem o gene topoisomerase II, o qual novamente permite identificação específica enquanto também revela algumas diferenças intraespecíficas.

A seleção criteriosa de genes-alvo pode melhorar potencialmente a identificação de organismos morfologicamente atípicos, difíceis de identificar, como por exemplo, nos casos de infecções por *T. violaceum* em unha imbricata.

A utilização de sequências-alvo conservadas obtidas da subunidade ribossômica 18S-rRNA permite a detecção de quantidades mínimas do DNA fúngico na escala de 10 pg.

Um par de iniciadores universais, FUP 28SF1 e FUP635, foi empregado em teste *nested*-PCR para detectar o gene ribossômico 28S de todos os fungos relevantes relacionados a onicomicose. Iniciadores universais de dermatófitos, DPUP, foram usados para detectar dermatófitos e as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. O teste foi adequado para material de unhas, 83% o foram por dermatófitos e 17% por não dermatófitos.

Nem sempre os procedimentos de observação microscópica e cultivo dos materiais biológicos podem ser realizados ou fornecem resultados positivos. A positividade das culturas pode ser prejudicada pela presença de contaminantes nos materiais semeados e, na maioria das vezes, o tempo requerido para o isolamento do fungo é longo. No futuro será possível refinar os processos de identificação de forma que pequenas variações no genoma dos fungos possam ser detectadas e usadas para rastrear a disseminação de infecções, sua persistência após o tratamento, e para identificar geneticamente características fenotípicas clinicamente importantes.



## Características gerais dos três gêneros de dermatófitos

### Gênero *Epidermophyton*

Este gênero é caracterizado pela ausência de esporos pequenos, denominados microconídios, e presença de macroconídios grandes, largos, clavados de parede lisa, com até nove septações (20 a 60 µm de comprimento por 4 a 13 µm de largura). Aparecem isolados ou em cachos com 2 ou 3 conídios. *E. floccosum* é a única espécie patogênica para o homem, invadindo pele, unhas e, raramente, cabelo.

### Gênero *Microsporum*

Espécies de *Microsporum* produzem macroconídios e microconídios raros ou numerosos, dependendo do meio e do substrato. A identificação da espécie depende muito das características de cada macroconídio, que é de parede rugosa, equinulada a verrucosa. Os macroconídios também variam na forma, tamanho (6 a 160 µm × 6 a 25 µm), número de septos (até 15) e espessura da parede celular. Microconídios são piriiformes ou clavados e aparecem, em geral, isolados ao longo das hifas. Espécies de *Microsporum* invadem cabelo e pele e, mais raramente, unhas.

### Gênero *Trichophyton*

Neste gênero os macroconídios têm parede lisa, fina ou espessa, variável na forma (clavados, fusiformes ou cilíndricos), no número de septos (até 12) e no tamanho (8 a 86 µm × 4 a 14 µm). Aparecem únicos ou em cachos. Microconídios são geralmente, mais numerosos do que macroconídios e podem ser globosos, piriiformes ou clavados, dispor-se isoladamente ou em cachos. A produção abundante de microconídios é o aspecto mais característico deste gênero.

## ► Micoses cutâneas e sistêmicas

### ■ Candidíase

A candidíase ou candidose é infecção primária ou secundária causada por espécies do gênero *Candida*. Embora este gênero compreenda 163 espécies, mais de 60% das infecções são causadas por *Candida albicans*.

O conhecimento da ecologia de leveduras revela que diversas espécies de *Candida* sp. fazem parte da flora de indivíduos saudáveis e que estão amplamente distribuídas no meio ambiente, na fauna e flora, solo e água.

*C. albicans* é comensal do trato gastrointestinal e genit urinário do homem e de vários animais de sangue quente. Nos estudos de prevalência de espécies de *Candida* nos diferentes sítios anatômicos os resultados dependem, em grande parte, do grupo populacional, do tipo de material clínico analisado e dos métodos laboratoriais empregados.

Entre as espécies de *Candida* presentes na cavidade bucal, *C. albicans* é a mais frequente (70%), seguida de *C. tropicalis* (6,7%), *C. glabrata* (6,6%), *C. parapsilosis* (1,9%), *C. krusei* (1,7%), *C. kefyr* (1%) e *C. guilliermondii* (0,4%). A presença de leveduras na boca é mais alta em bebês no período entre 1 semana e 18 meses de idade (46%). Recém-nascidos podem adquirir a levedura ao nascer, durante o parto, ou por meio de mamadeiras contaminadas ou, ainda, por manipulação de pessoal de enfermagem, portadores assintomáticos do fungo. Maior frequência de leveduras é encontrada em usuários de próteses ou diabéticos e indivíduos que fazem uso de dietas

com açúcares. Talvez esta última condição explique a forte associação entre leveduras e pessoas de meia-idade.

Pessoas com higiene oral deficitária têm maior quantidade de leveduras na boca; a frequência na cavidade bucal pode variar de 2 a 69%. A língua, seguida do palato e da mucosa bucal, é o local de predileção de espécies de leveduras. A população de leveduras no trato gastrointestinal é ainda mais elevada, tanto no estômago quanto nos intestinos; aqui também *C. albicans* é a levedura mais isolada.

A presença de leveduras no canal vaginal foi exaustivamente confirmada, e a frequência em mulheres aparentemente saudáveis alcança taxas de 30%. A concentração e a frequência de leveduras no conduto vaginal são maiores em jovens que usam roupas apertadas. A alta prevalência de leveduras é encontrada em mulheres grávidas, no 3º trimestre de gravidez, e cai drasticamente após o parto, sugerindo que fatores fisiológicos relacionados à gravidez predisõem o epitélio vaginal à colonização fúngica. Por outro lado, o uso de antibióticos, contraceptivos hormonais e estágios do ciclo menstrual, fatores considerados importantes, nem sempre se correlacionam diretamente com um maior número de leveduras.

Altas concentrações de progesterona e estradiol, alteração do pH e aumento da concentração de glicogênio no conteúdo vaginal são condições propícias ao desenvolvimento de *Candida* e manifestação clínica de vulvovaginite. *C. albicans* é a espécie mais frequente em grupos de mulheres sem sintomatologia aparente, assim como naquelas que apresentam quadro de vaginite (84%), seguida de *C. glabrata* e outras. Leveduras são raramente isoladas de pênis, exceto de parceiros sexuais de mulheres com candidíase vaginal.

*C. albicans* não é normalmente encontrada na pele de pessoas saudáveis, no entanto, pode ser encontrada em fissuras intertriginosas dos dedos ou da região perianal. Isolamentos dessa espécie são comuns da pele das nádegas de bebês com dermatite e dos interdígitos de pacientes com “pé de atleta”. A instalação dessas manifestações cutâneas depende de fatores ambientais, sudorese, oclusão e resposta inflamatória do hospedeiro.

As formas clínicas de candidíase são diversas, incluindo micoses cutâneas (unha, pele, mucosas), candidíase mucocutânea crônica, infecção de corrente sanguínea, endocardite, meningite, peritonite, gastroenterite, endoftalmite, infecção de suprarrenais e, raramente, pneumonia.

Cerca de outras 20 espécies já foram descritas como agentes de quadros clínicos e, portanto, a definição acurada da etiologia do processo é necessária em estudos de interesse epidemiológico. As espécies envolvidas em infecções são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*), *C. lusitaniae*, *C. viswanathii* e *C. famata*. A distribuição das espécies está relacionada ao sítio topográfico de infecção e material clínico. *C. parapsilosis* é um dos principais agentes de endocardite associada ao uso de cateteres. *C. tropicalis* é o principal patógeno envolvido em infecção disseminada em pacientes imunocomprometidos a partir de fezes. *C. lusitaniae* foi isolada de casos graves com infecção de corrente sanguínea (fungemia), e *C. viswanathii*, de LCR de paciente com meningite.

*C. dubliniensis* é considerada levedura emergente, patogênica de cavidade bucal de pacientes HIV-positivos e AIDS e de usuários de drogas intravenosas. Foi descrita em mulheres com vaginite sem associação à infecção pelo HIV e também isolada de fezes. Embora seja primariamente associada a episódios de candidíase oral em pacientes HIV-positivos, mais



recentemente foi associada a doenças sistêmicas em indivíduos transplantados ou com neoplasias.

Relatos isolados de infecção ocular pós-trauma e fungemia devido à *C. lipolytica* são encontrados na literatura. Do mesmo modo, *C. haemulonii* foi relacionada a casos de fungemia e *C. norvegensis*, a quadros de peritonite e doença invasiva.

Outras espécies, incluindo *C. catenulata*, *C. intermedia* e *C. zeylanoides*, são, ocasionalmente, isoladas de espécimes clínicos de pacientes com suspeita de micoses oportunistas, porém com dados insuficientes para caracterizá-las como agentes dos processos.

A candidíase não tem limitação geográfica, porque está mais relacionada com predisposição do hospedeiro do que a fatores geográficos. As condições mais frequentes são AIDS, intervenções cirúrgicas, imunossupressão iatrogênica, cateteres intravenosos, antibioticoterapia de longa duração, quimioterapia citorredutora, neutropenia, doenças hematológicas e degenerativas, queimaduras de grande extensão e uso de drogas injetáveis.

*C. albicans* é isolada do meio ambiente em águas poluídas, águas marinhas, solo, ar e plantas, e é atribuída a contaminação recente por excrementos humanos ou animais. Por esse motivo, alguns autores consideram sua ocorrência uma indicação de poluição, principalmente em águas de recreação. Outras espécies de *Candida* também contaminam bebidas e gêneros alimentícios.

*Candida albicans* não é uma entidade única, mas um conjunto de fenótipos e genótipos. A caracterização por tipagem fenotípica ou genotípica é de grande interesse em epidemiologia, para estudos de prevalência temporal e espacial. Diversos métodos de tipagem, dentro desse objetivo, foram desenvolvidos. Os resultados permitem a conclusão de que, com poucas exceções, os indivíduos carregam o mesmo tipo de *C. albicans* em diferentes sítios. Os estudos mostram também que determinados biotipos têm afinidade com determinados sítios anatómicos.

Em relação à patogenicidade, verifica-se que os mesmos tipos podem ou não estar associados a sintomas clínicos de vaginite. O mesmo foi demonstrado em estudos de candidíase oral e esofágica em pacientes com AIDS. No caso de candidíase vaginal de repetição, os mesmos tipos ou tipos com pequenas diferenciações são isolados em episódios sequenciais. Em casos de candidíase sistêmica, os tipos prevalentes são iguais aos isolados de infecções superficiais. Por meio de estudos de tipagem, verifica-se também que a candidíase sistêmica de origem hospitalar pode ser causada por diversos tipos ou cepas de *C. albicans*.

Nas infecções sistêmicas, embora a *C. albicans* seja o patógeno mais isolado, a incidência da infecção de corrente sanguínea por outras espécies, tais como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae*, foi registrada nos últimos anos. *C. parapsilosis* é cada vez mais isolada do sangue de pacientes hospitalizados. A importância de *C. tropicalis* é ressaltada, sendo relatada como agente infeccioso com alta mortalidade e associada à infecção sanguínea, bem como em casos de surtos de candidúria. *C. krusei* é considerada emergente e é isolada geralmente de pacientes com câncer. *C. glabrata* se apresenta em 3º lugar como causa de infecção hospitalar em diversos estudos. Ressalta-se ainda a sua resistência ao fluconazol e a outros azóis, fato que contribui com o aumento de infecções em que esses fármacos são utilizados, em muitos casos como profilaxia. Infecções por *C. guilliermondi* em pacientes cirúrgicos após nutrição parenteral e uso de cateter também têm sido descritas.

*C. dubliniensis* está associada a candidíase da mucosa bucal em pacientes infectados pelo HIV. Esta espécie apresenta características morfológicas e bioquímicas semelhantes às da *C. albicans*, o que torna necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las. Alguns testes fenotípicos são aplicados para a diferenciação das duas espécies, como o uso de CHROMagar-PAL Candida. Em unidades de terapia intensiva de neonatos, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* também são encontradas, correspondendo a quase 10% das infecções fúngicas, e *C. parapsilosis* tem se destacado como causadora de candidíase sistêmica neonatal.

### Diagnóstico laboratorial

Os espécimes clínicos mais comuns no laboratório clínico para diagnóstico da candidíase são escamas obtidas por raspagem de lesões cutâneas e unhas, secreção de mucosa, pus, secreções diversas, tecidos obtidos por biopsias, sedimento de urina centrifugada, líquido cefalorraquidiano, líquidos pleural e peritoneal, sangue e material de medula óssea.

O diagnóstico de candidíase depende da demonstração de leveduras em brotamento, pseudo-hifas ou hifas nos tecidos e do isolamento do fungo em cultura. Formas típicas de candidíase incluem pseudo-hifas, com ramificações e constrição no septo com produção de blastoconídios ovais perto do septo. As células e pseudo-hifas comumente medem 3 a 5 µm de diâmetro. A taxa de produção de hifas *in vivo* varia amplamente, e depende da cepa infectante, assim como do hospedeiro. Em algumas lesões, o crescimento de hifas é profuso com pequeno número de leveduras, mas existem lesões em que predominam as formas de blastoconídios em vez de hifas e pseudo-hifas.

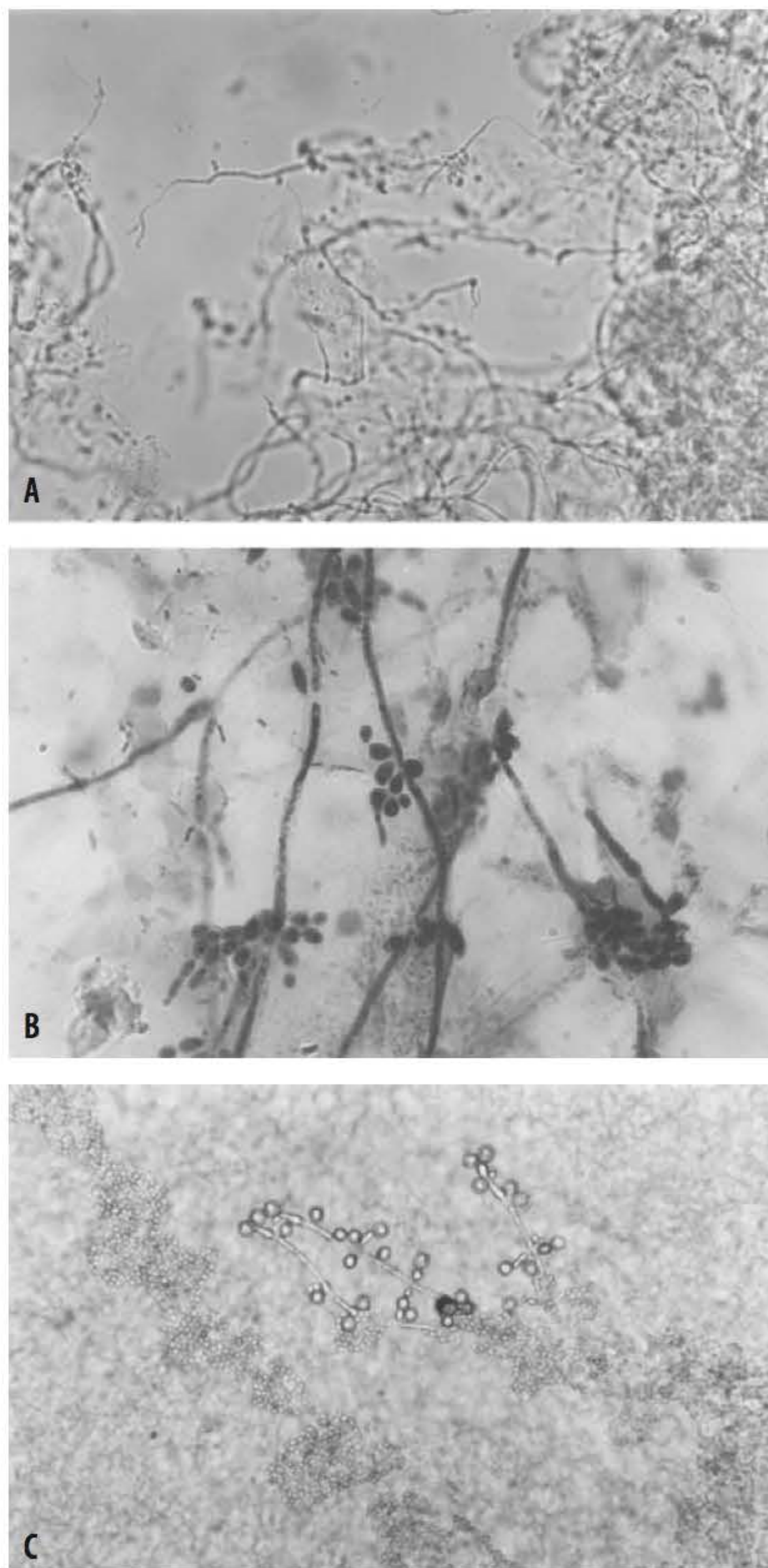
A observação de hifas ou pseudo-hifas no material biológico pode ser feita pelo exame “a fresco” (sem corante) ou em preparações citológicas (Figura 32.22). A observação do espécime “a fresco” é método rápido e tem boa sensibilidade quando feita por pessoas treinadas. A coloração de Gram é também bastante utilizada; as colorações de células de *Candida* pelo Giemsa ou Wright são úteis para o diagnóstico. O uso do calcoflúor branco é uma técnica muito sensível, embora requiera microscópio fluorescente. O método que apresenta a maior sensibilidade para visualizar hifas ou pseudo-hifas em cortes histológicos é o método de Gomori, que permite avaliar melhor o grau de invasão no tecido do hospedeiro.

No material obtido por biopsia a presença de pseudo-hifas de *Candida* pode ser de difícil distinção de hifas de *Aspergillus* quando não são observados blastoconídios. Por outro lado, *C. glabrata* não forma pseudo-hifas e seus blastoconídios, de pequeno tamanho, podem ser confundidos com os de *H. capsulatum*. No caso de fungemia por *Candida*, células de levedura podem ser visualizadas em esfregaços corados. Esfregaços de LCR, humor vítreo, líquido sinovial e peritoneal são rápidos, mas pouco sensíveis. O líquido deve ser primeiro centrifugado e uma lâmina do sedimento deve ser corada.

Métodos variados para pesquisa do agente no espécime clínico podem ser utilizados no diagnóstico. Estes se baseiam na detecção de antígeno circulante, anticorpos específicos, metabólitos fúngicos e DNA fúngico pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Esses métodos estão em constante desenvolvimento e parecem ser alternativas promissoras no diagnóstico de candidíase disseminada.

Resultado em exame direto positivo: presença de blastoconídios e hifas (ou pseudo-hifas) compatíveis com *Candida* sp.





**Figura 32.22** Pseudo-hifas e blastoconídios compatíveis com *Candida* sp. **A.** KOH (400 ×). **B.** Gram (1.000 ×); **C.** Microcultivo de *Candida albicans* (400 ×).

### Cultura

O crescimento de *Candida* sp. em meios de cultura é fácil e rápido. Culturas de escamas de pele ou de mucosa comprovam o agente etiológico de dermatomicose quando o exame direto tiver sido positivo. Porém, as culturas têm menor valor diagnóstico se forem isoladas das regiões bucal, vaginal e anal, pois *Candida* faz parte da flora normal desses sítios.

O isolamento de espécies de *Candida* do trato digestivo, respiratório ou urinário também é de difícil interpretação. Não há consenso quanto a limites de corte para a distinção entre colonização e infecção. Sugere-se o número de  $10^3$  ufc/ml de urina coletada de jato livre como parâmetro de separação. Mas, se a urina for coletada por punção ou sonda, qualquer valor pode ser significativo. O diagnóstico deve ser feito em bases clínica e epidemiológica, diante dos achados laboratoriais.

Do mesmo modo, o isolamento de *Candida* de fezes deve ser interpretado de maneira cuidadosa e individualizada, especialmente se o paciente apresentar fatores predisponentes para micoses oportunistas. Culturas de urina podem ser úteis em identificar pacientes com candidíase disseminada por *C. tropicalis*.

O isolamento de espécies de *Candida* de materiais biológicos ditos nobres, tais como líquidos peritoneal e sinovial, LCR, medula óssea ou tecido obtido por biopsia profunda, deve sempre ser interpretado como significativo, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Porém, o isolamento de espécies de *Candida* em hemoculturas nem sempre indica infecção disseminada, mas é um importante indicador de infecção, que merece investigação clínica.

*Candida* não requer meios enriquecidos para seu crescimento. Vários meios de cultura podem ser utilizados, inclusive o clássico ágar Sabouraud, com antibióticos antibacterianos. No entanto, meios de cultura que contenham cicloeximida devem ser evitados porque certas cepas de *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são sensíveis a esta substância. Os tubos de cultura são incubados a 30°C e examinados nas primeiras 24 a 48 h; se não houver crescimento, devem permanecer por até 2 semanas. A grande maioria das espécies de *Candida* cresce rapidamente, porém cepas de *C. guilliermondii* podem demorar mais de 1 semana. Espécimes clínicos ricos em matéria orgânica, como secreção respiratória, permitem o crescimento abundante de leveduras e podem dar a falsa impressão de que o fungo está presente em grande quantidade e está invadindo o tecido pulmonar. Esta é uma interpretação falsa, e o número de colônias não tem relação com o quadro clínico.

Assim como para outros fungos, existem métodos especiais recomendados para o isolamento de *Candida* a partir do sangue. Os mais utilizados são: lisocentrifugação, sistema radio-métrico e meio de cultura bifásico. No caso de hemocultura em meios líquidos é recomendada aeração durante incubação, que pode ser feita com agitação diária dos frascos, para aumentar a sensibilidade do método. O isolamento em meio bifásico, por exemplo BHI líquido e sólido no mesmo frasco, tem grande utilidade e rendimento comparável ao da lisocentrifugação.

### Identificação de espécies de *Candida*

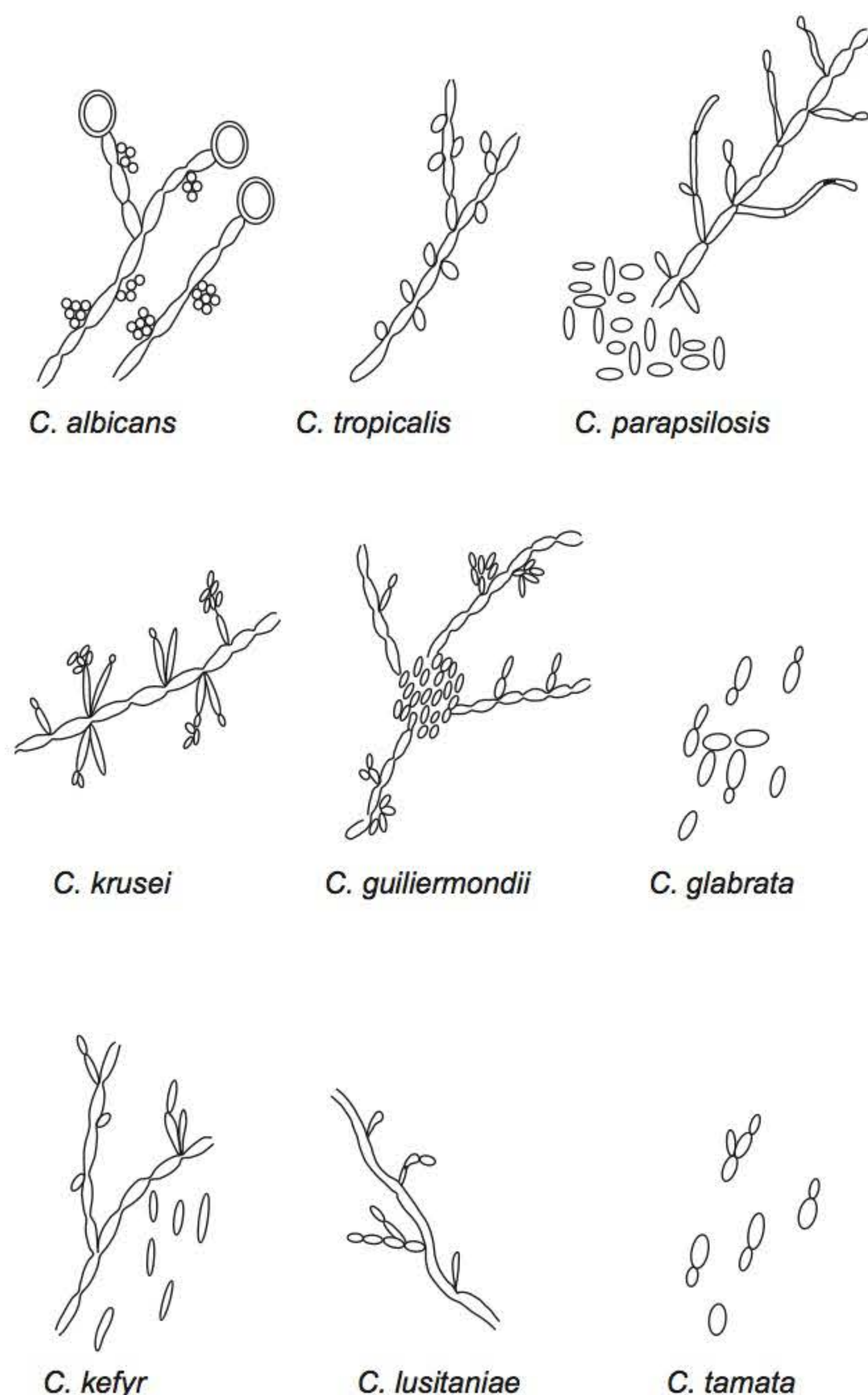
No gênero *Candida* estão incluídas leveduras com as seguintes características gerais: teste do azul de diazônio (DBB) negativo, ausência de pigmento carotenóide ou melanina; células globosas, elípticas, cilíndricas ou triangulares, sem capacidade de formar compostos semelhantes ao amido, potencial para formar hifas verdadeiras ou pseudo-hifas, brotamento holoblástico (não fialídico), ausência de balistoconídios e artroconídios.

O gênero *Candida* é classificado na família Cryptococcaceae, divisão Deuteromycota, classe Blastomycetes. A diferenciação específica deste gênero é baseada em aspectos morfológicos e fisiológicos. Os aspectos morfológicos microscópicos de algumas espécies de interesse médico estão representados na Figura 32.23.

As técnicas convencionais para a identificação das espécies de *Candida* baseiam-se principalmente em métodos bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, habilidade de formar tubos germinativos a 37°C em soro e produzir clamidoconídios em ágar *Corn-meal* (Difco) acrescido de tween 80.

Nos últimos anos, diferentes meios cromógenos de cultura com capacidade de diferenciar *C. albicans* e outras leveduras





**Figura 32.23** Características morfológicas de espécies de *Candida* de interesse médico.

de interesse clínico foram lançados comercialmente. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias por meio de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos. O meio de cultura CHROMagar é utilizado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Este meio permite a identificação presuntiva das leveduras por conter vários substratos enzimáticos que, hidrolisados pelas hexoaminidases correspondentes, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia em 24 a 48 h. O meio utilizado indica colônias verde-claras para *C. albicans*, verde-escuras para *C. dubliniensis* e azuis para *C. tropicalis*. No entanto, a diferenciação entre elas é bastante difícil.

Foi descrito que o CHROMagar, quando suplementado com ágar Pal, diferencia *C. dubliniensis* de *C. albicans*, sendo a primeira de cor verde-azulada e a segunda verde.

*Candida albicans*, a principal espécie patogênica, cresce bem em ágar Sabouraud em 3 dias a 25 a 37°C, formando colônia branca a creme, lisa e brilhante. As colônias em ágar malte mostram melhor sua variação em características de superfície e franjas. A característica macroscópica da superfície da colônia é instável, podendo mudar da forma lisa para a rugosa, porém as características das franjas são relativamente estáveis.

A colônia é composta de células globosas, ovais a alongadas, de vários tamanhos. Alguns isolados frequentemente pro-

duzem células globosas com brotos polares ou múltiplos. Dois diferentes processos morfogênicos podem ocorrer no gênero *Candida*, além da formação de blastoconídios: pseudo-hifas e hifas verdadeiras. A formação de blastoconídios é favorável em condições de pH ácido e glicose como fonte de carbono. A pseudo-hifa origina-se após brotamentos sucessivos e a separação entre célula-filha e célula-mãe não ocorre. A cadeia de brotos se desenvolve com o alongamento e união das células, assemelhando-se a uma hifa. No entanto, diferenciam-se das hifas verdadeiras pela presença de constrições nos septos.

A capacidade de produção de pseudo-hifa é característica de quase todas as 163 espécies de *Candida*. A formação da hifa verdadeira, no entanto, só ocorre em poucas espécies e se dá a partir do tubo germinativo. O tubo germinativo é a germinação de um blastoconídio, portanto, não há septo entre o blastoconídio e o tubo formado. A formação de hifas é favorecida em pH acima de 6,5, a 37°C e diante de fontes de carbono com alto peso molecular, não fermentáveis.

Os métodos convencionais para a identificação de espécies de *Candida* e outros gêneros, com base em testes fisiológicos, auxanograma e zimograma, requerem períodos que podem ser longos para a leitura dos resultados. Os laboratórios clínicos necessitam, porém, dispor de métodos cada vez mais eficientes. Além disso, a frequência de infecções graves em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados vem aumentando progressivamente, pressionando a otimização dos métodos. Vários sistemas rápidos são hoje disponíveis no mercado internacional; no entanto, esses sistemas podem não ser adequados para cepas atípicas, além de apresentarem outras restrições.

Dentre os testes clássicos, existem dois testes rápidos que permitem identificar *C. albicans*. Os testes se fundamentam na formação de tubo germinativo e clamidosporos. A formação de tubo germinativo e de clamidosporos são os dois principais critérios morfológicos para a identificação de *Candida albicans*. O tubo germinativo é obtido em meios com albumina ou soro animal a 37°C, e clamidosporos são formados em ágar fubá com tween 80 a 25°C a 30°C. Aproximadamente 90% dos isolados de *C. albicans* produzem clamidosporos (Figura 32.22C). Porém, uma pequena porcentagem de isolados de *C. albicans* dá resultados falso-negativos. O teste do tubo germinativo, por outro lado, apresenta altos índices de resultados falso-positivos (ver Testes fisiológicos).

*C. albicans* e *C. dubliniensis* são bastante similares. No entanto, existem diferenças significativas entre as duas espécies. *C. dubliniensis*, ao contrário de *C. albicans*, cresce pouco ou não cresce a 42 a 45°C sobre ágar batata-dextrose, na ausência de  $\beta$ -glicosidase intracelular, e algumas cepas exibem resistência ao fluconazol *in vitro*. Por técnicas moleculares, como PCR, podem-se identificar e diferenciar espécies de *Candida* em menos de 4 h. A assimilação de  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, lactato e trealose, pode também diferenciar as duas espécies.

No Quadro 32.15 são apresentadas as características morfológicas e bioquímicas das principais espécies de *Candida* de interesse médico.

### Imunodiagnóstico

Em certas situações clínicas, os testes para pesquisa de anticorpos anti-*Candida* são úteis e resultados positivos são encontrados em 90% dos pacientes com infecções endovasculares, especialmente com endocardite. No entanto, os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos são de valor limitado em pacientes imunodeprimidos. Testes como imunodifusão dupla, contraímunoeletroforese, aglutinação de partículas de



Quadro 32.15 ▪ Características fisiológicas e bioquímicas de espécies de *Candida* isoladas de espécimes clínicos.

Espécies	Crescimento a 37°C	Película em meio líquido	Hifas ou pseudo-hifas	Clamidosporos	Tubo germinativo	Cápsula, tinta da China	Ascosporos	Assimilação											Fermentação									
								Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Celobiose	Melezitose	Xilose	Rafinose	Trealose	Dulcitol	Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Trealose	Urease	Utilização de KNO <sub>3</sub>	Fenol oxidase
<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	v	-	+	-	-	v	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. catenulata</i>	v	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	v	-	+	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	+	-	-	-	++	+	+	+	-	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	-	v	+	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	v	+	-	v	-	+	+	v	-	+	-	+	v	+	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> <sup>a</sup>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	v	-	-
<i>C. lipolytica</i> <sup>a</sup>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. lusitaniae</i> <sup>b</sup>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> <sup>c</sup>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> <sup>b,d</sup>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	v	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	-	v	+	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	v	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

v = variação entre as cepas; <sup>a</sup> = *C. lipolytica* assimila eritritol; *C. krusei*, não. Temperatura máxima de crescimento: 43 a 45°C para *C. krusei* e 33 a 37°C para *C. lipolytica*; <sup>b</sup> = *C. lusitaniae* assimila ramnose; *C. tropicalis*, geralmente não; <sup>c</sup> = *C. parapsilosis* assimila L-arabinose; <sup>d</sup> = *C. tropicalis* geralmente não pode formar ascósporos em meios especiais; + = reação positiva; - = reação negativa.



látex e testes imunoenzimáticos que empregam uma variedade de antígenos, como manana, antígenos citoplasmáticos, frações específicas e, mais recentemente, antígenos de tubo germinativo foram empregados com resultados variáveis, dependendo do imunocomprometimento humoral do paciente.

Quando se trata do sorodiagnóstico de candidíase disseminada, a pesquisa de antígeno circulante reveste-se de importância devido ao fato de anticorpos anti-*Candida* não distinguirem indivíduos com candidíase transitória de formas patentes da doença ou de indivíduos aparentemente normais.

A maioria dos testes sorológicos detecta componentes da parede celular ou antígenos citoplasmáticos, tais como manana, glucana, enolase, proteína de 47 kDa e outras. Atualmente, dispõe-se de testes que empregam reações de aglutinação com partículas de látex (comerciais) ou imunoenzimáticos para a pesquisa de manana, empregando anticorpos monoclonais, bem como anticorpos anti-enolase em ensaio de EIA sanduíche.

Mesmo usando-se esses testes os valores de sensibilidade e especificidade são relativamente baixos, pois alguns antígenos, como manana, são liberados em quantidades pequenas e a antigenemia é transitória. Atualmente, estão em desenvolvimento testes que detectam diferencialmente  $\alpha$  e  $\beta$ -manana no intuito de aumentar o valor diagnóstico dos testes.

### Métodos moleculares

A candidíase invasiva é causa de altas taxas de mortalidade, e o diagnóstico rápido é necessário para melhorar o prognóstico desses pacientes. A sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares tornam-se alternativas promissoras, que podem levar a um diagnóstico mais precoce. A crescente disponibilidade de sequências do DNA possibilitou a análise comparativa, constituindo uma ferramenta alternativa atraente para a identificação de fungos. Metodologias de sequenciamento de DNA podem ser adquiridas comercialmente ou desenvolvidas internamente. Esses métodos mostram diferentes graus de utilidade, dependendo da abrangência e confiabilidade das bases de dados utilizados para comparação. O sucesso futuro de abordagens fundamentadas em sequenciamento dependerá da escolha do alvo do DNA, da confiabilidade do resultado e da disponibilidade de um banco de dados de sequências validadas para consulta e comparação.

Desde a década de 1990, diversos métodos de diagnóstico de base molecular têm sido desenvolvidos e testados, e com eles se persegue a detecção de sequências genômicas específicas de *Candida* para alcançar um método de diagnóstico rápido e confiável para a detecção de candidíase invasiva. Qualquer método de diagnóstico molecular para a candidíase necessita definir pelo menos os seguintes aspectos: o mecanismo de extração de DNA da levedura, o sistema de eliminação de possíveis moléculas que inibem ou interferem na reação de amplificação, o alvo no genoma e o sistema de leitura ou de detecção dos produtos amplificados. Uma vez estabelecido o sistema é necessário que seja aplicável para amostras clínicas, sendo especialmente importante que permita a detecção de *Candida* sp. em amostras de sangue com alta sensibilidade e especificidade.

A maioria das metodologias até então utilizadas para o diagnóstico da candidíase invasiva é baseada em PCR e permite a detecção mais especificamente do gênero, a espécie e até a carga fúngica. Os genes mais comumente usados como alvo incluem os genes ribossômicos (rDNA 18S, 28S rDNA, ITS2 e regiões ITS1), altamente conservados e estáveis, e também regiões com variabilidade espécie-específica intragênero (espaçadores), que conferem uma especificidade muito alta para a detecção e identificação de espécies de *Candida*, e, menos frequentemente, os genes mitocondriais. Um dos problemas mais sérios que essas

técnicas apresentam é o alto risco de falsos-positivos. Devido à elevada sensibilidade do método, uma eventual contaminação da amostra antes da amplificação resulta em positividade. Os protocolos de PCR em tempo real, que minimizam a manipulação de amostras e produtos de PCR, são propostas interessantes para evitar esses problemas. A elevada sensibilidade do método, somada à possibilidade de quantificação, pode facilitar o estabelecimento de critérios de avaliação para descartar falsos-positivos por contaminação, assim como diferenciar situações de colonização e infecção fúngicas. Mais recentemente, estudos que aplicaram Multiplex-Tandem PCR para diagnóstico da candidemia mostraram sensibilidade de até 97% e possibilitaram a detecção e identificação de espécies de *Candida* em soro e plasma.

Estudos recentes sugerem que é necessária a combinação de técnicas para detectar antígeno, anticorpo, (1-3)- $\beta$ -D-glucana e DNA para otimizar o diagnóstico. Alguns dos mais importantes métodos moleculares de diagnóstico testados para diferentes espécies de *Candida* se encontram no Quadro 32.16.

*Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* são espécies fenotipicamente indistinguíveis de *Candida parapsilosis* e foram recentemente descritas. Os métodos moleculares para a detecção dessas espécies a partir de hemocultura podem ser testados por PCR utilizando-se o gene marcador SADH (gene álcool desidrogenase) seguido por digestão com a enzima de restrição *NlaIII* (PCR RFLP). A análise do perfil do gene SADH, após digestão com *NlaIII*, permite a discriminação e identificação dessas espécies. Os isolados com padrões distintos obtidos por RFLP são, então, caracterizados por análises de sequências do ITS1-ITS2 26S rRNA (D1/D2) e regiões do SADH.

Alguns dos métodos moleculares para a discriminação das espécies fenotipicamente indistinguíveis de *Candida parapsilosis* se encontram no Quadro 32.17.

### ■ Criptococose

A criptococose é doença causada pelas leveduras capsuladas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* no homem e animais (gado bovino, equino, cães, felinos, porcos e coalas). Outras espécies de *Cryptococcus* podem estar envolvidas, embora com rara frequência: *C. albidus*, *C. laurentii* e, mais recentemente, *C. uniguttulatus* foram isolados de casos humanos.

O gênero *Cryptococcus* tem mais de 38 espécies, mas duas delas causam enfermidades principalmente em humanos: *C. neoformans* e *C. gattii*. A espécie *neoformans* apresenta duas variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*, e, ainda, cinco sorotipos: A para variedade *grubii*, D e AD para a variedade *neoformans* e B e C para a espécie *gattii*.

*C. neoformans* e *C. gattii* são basidiomicetos, classificados na forma teleomórfica como *Filobasidiella*, e seu estado sexuado é obtido pela conjugação de duas cepas compatíveis,  $\alpha$  e  $a$ . A espécie *neoformans* apresenta uma variedade, *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*, sorotipos A e D, e outra, *F. bacillispora*, sorotipos B e C, dentro da família Filobasidiaceae.

A associação de *C. neoformans* e *C. gattii* excretas de várias espécies aviárias, de árvores e madeiras em decomposição levantou a questão sobre a possibilidade de que essas fontes sejam as naturais ou seus nichos primários, tem sido atribuída a uma série de adaptações bioquímicas que permitiriam a sobrevivência e seu crescimento nesses nichos. Estudos epidemiológicos realizados antes do advento da AIDS mostram que a var. *neoformans* era amplamente distribuída, enquanto a var. *gattii* era restrita às regiões tropicais e subtropicais. Com o surgimento da AIDS, a porcentagem de casos da variedade *gattii* diminuiu significativamente, pois a grande maioria de pacientes com AIDS tem a infecção por *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A).



**Quadro 32.16 • Métodos moleculares aplicados no diagnóstico de candidíase.**

Espécime clínico	Método diagnóstico		Eficácia		Referência
	Técnica	Alvo	Sensibilidade	Especificidade	
Sangue animal	PCR-EIA	rDNA/ITS	2 cél/200 $\mu\ell$ (10 cél/mL)	var*	Fujita <i>et al.</i> , 1995
Hemocultivo positivo	PCR-EIA	rDNA/ITS	10 <sup>2</sup> cél/200 $\mu\ell$ (100%)	100%	Shin <i>et al.</i> , 1997
Sangue	PCR-SB	rDNA/ITS	1 ufc/mL (100%)	98%	Einsele <i>et al.</i> , 1997
Hemocultivo	PCR fluoresc	rDNA/ITS	10 <sup>2</sup> cél/200 $\mu\ell$	100%	Shin <i>et al.</i> , 1999
Sangue	PCR_LiPA	rDNA/ITS	2 a 10 cél/mL (100 fg)	var*	Martin <i>et al.</i> , 2000
Sangue	Nested-PCR	Gene P450	< 10 cél	100%	Khan <i>et al.</i> , 2001
Hemocultivos positivos	Multiplex PCR	rDNA/ITS	96,9%	87,5%	Chang <i>et al.</i> , 2001
Hemocultivo positivo	Multiplex PCR	rDNA/ITS	20 cél/2 $\mu\ell$	100%	Fujita <i>et al.</i> , 2001
Sangue	Nested-PCR	Gene P450	< 10 cél	100%	Khan <i>et al.</i> , 2001
Soro	PCRsn ELISA yEIA	rDNA/ITS	1 cél/mL	99%	Ahmad <i>et al.</i> , 2002
Sangue	PCR-rt	rDNA/ITS	5 ufc/mL (100%)	72 a 97%	Maaroufi <i>et al.</i> , 2003
Hemocultivos positivos	PCR-rt	rDNA/ITS	1 fg DNA 100%	100%	Selvarangan <i>et al.</i> , 2003
Hemocultivo	Sequenciamento PCR	rDNA/ITS	100%	100%	Iwen <i>et al.</i> , 2004
Sangue/soro	Real-time	18S rRNA	95	97	White, 2005
Sangue/soro	Real-time*	18S rRNA	93	66	Dunyach, 2008
		ITS	77	100	
Sangue/soro	Real-time 18S rRNA	ITS1/2	91	100	McMullan, 2008

\*Quantitative QIAamp DNA Blood minikit (Qiagen, França) = *kit* extração de DNA. Adaptado parcialmente de Khot e Fredricks, 2009.

**Quadro 32.17 • Resumo de estudos publicados de métodos de identificação com distribuição de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.**

Método usado para diferenciação	Origem dos espécimes	Número de isolados (%) por espécie			País ou região	Referência
		<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>		
MLST, RAPD-PCR, <i>SADH</i> -RFLP	Fontes clínicas diversas	20 (74,1%)	7 (25,9%)	0	EUA, Europa, África, Ásia	Tavanti <i>et al.</i> , 2005
Sequenciamento PCR direto de BacTec	Sangue e outras fontes clínicas	8 (88,9%)	1 (11,1%)	0	Austrália	Pryce <i>et al.</i> , 2006
Sequenciamento ITS, RAPD-PCR, dados de fenotipagem	Sangue e outras fontes clínicas	18 (90%)	0	2 (10%)	Hungria	Kocsubé <i>et al.</i> , 2007
<i>SADH</i> -RFLP, AFLP	Fontes clínicas diversas	277 (95,5%)	13 (4,5%)	Não informado	Itália	Tavanti <i>et al.</i> , 2007
<i>SADH</i> -RFLP, AFLP	Fontes clínicas diversas	375 (94,9%)	Não informado	20 (5,1%)	Itália	Hensgens <i>et al.</i> , 2009
Sequenciamento ITS	Sangue	67 (85,9%)	5 (6,4%)	6 (7,7%)	Espanha	Gomez-Lopez <i>et al.</i> , 2008
<i>SADH</i> -RFLP	Amostras clínicas invasivas	1762 (92,1%)	117 (6,1%)	34 (1,8%)	Estudo global (89 países)	Lockhart <i>et al.</i> , 2008
Sequenciamento ITS, RAPD PCR	Sangue	29 (70,7%)	10 (24,4%)	2 (4,9%)	Malásia	Tay <i>et al.</i> , 2009
PCR com <i>primers</i> específicos, <i>SADH</i> -RFLP, D1/D2 e sequenciamento ITS	Sangue (66) e outras fontes clínicas (48)	109 (95,6%)	5 (4,4%)	0	Kuwait	Asadzadeh <i>et al.</i> , 2009
<i>SADH</i> -RFLP	Fontes clínicas e ambientais	160 (94,67%)	4 (2,37%)	5 (2,96%)	Portugal	Silva <i>et al.</i> , 2009
Sequenciamento ITS	Sangue	126 (88,1%)	13 (9,1%)	4 (2,8%)	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2010
<i>SADH</i> -RFLP, <i>SADH</i> , sequenciamento ITS e 26S	Sangue	75 (95%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	Dinamarca	Mirthendi <i>et al.</i> , 2010

SAD = Gene de álcool desidrogenase; MLST = tipagem baseada em sequências *Multilocus*. RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA-PCR) = amplificação aleatória de DNA polimórfico; SADH (alcohol dehydrogenase) = álcool desidrogenase secundária; RFLP (secondary alcohol dihydrogenase) = polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição; AFLP (amplified fragment length polymorphism) = polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado; ITS (internal transcribed spacer) = espaçador interno transcrito. Adaptado parcialmente de Mirthendi *et al.*, 2010.



*Cryptococcus* sp. tem as enzimas lacase e fenoloxidase, que fazem parte de um complexo enzimático com capacidade de degradar lignina presente em troncos e madeiras.

A infecção primária no homem ocorre quase sempre por via pulmonar, após inalação de propágulos da levedura. Acredita-se que a via inalatória seja a porta de entrada da infecção pelos basiosporos de *C. neoformans* e *C. gattii* a partir de fontes de contágio ambiental. Em animais, pode ocorrer após ingestão ou implantação traumática. A infecção pulmonar no homem é quase sempre subclínica e transitória; no entanto, pode resultar em disseminação por via hematogênica e ocorrer infecção do sistema nervoso central (SNC) na vigência de doença debilitante ou outros fatores. A criptococose pode se apresentar como infecção pulmonar, sistêmica ou do SNC, nas formas aguda (rara), subaguda ou crônica. Acredita-se que os propágulos da forma sexuada sejam inalados e se depositem nos espaços alveolares, devido ao seu diminuto tamanho ( $< 2 \mu\text{m}$ ). A prova de que a infecção tem início pela inalação do fungo é o isolamento de *C. neoformans* e *C. gattii* do ar atmosférico, além de evidências clínicas de inúmeros casos necropsiados com criptococose pulmonar primária. Além da meningite aguda ou crônica, nas formas disseminadas da doença podem ocorrer formas cutâneas primárias e criptococoma (granuloma pulmonar).

Até as décadas de 1950 e 1960, a criptococose ocorria esporadicamente em seres humanos e animais. Com o advento de terapias imunossupressoras agressivas, aumentaram progressivamente os casos confirmados dessa doença. Na década de 1980, com a pandemia da imunodeficiência adquirida (AIDS), o número de casos descritos passou a ser bastante alto, e hoje a síndrome é o maior fator predisponente para a doença. Criptococose ocorre em 6 a 8% dos pacientes com AIDS nos EUA, Europa e América do Sul, e em até 35% dos pacientes na África. Esta maior prevalência reflete a maior exposição ao fungo nesse continente.

No Brasil ocorre em cerca de 6% dos pacientes HIV-positivos, ocupando a posição de 2ª doença neurológica mais prevalente em pacientes brasileiros com AIDS, e 5% deles têm a micose na forma de meningite. Portanto, a manifestação da doença no SNC leva à suspeita de AIDS na sua grande maioria. Nos EUA, é a 4ª infecção oportunística associada à AIDS. Em relação a ocupação e raça, não há diferenças na incidência da doença.

Outros fatores de predisposição para a aquisição e manifestação da doença são corticoterapia, doenças malignas, transplantes, diabetes e cirrose hepática.

### Diagnóstico diferencial

A criptococose do SNC deve ser diferenciada da meningite por *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Brucella*, *Actinomyces* ou espécies de *Arachnia*, ou mesmo de tumor cerebral.

A criptococose na forma pulmonar é indistinguível clinicamente de outras infecções pulmonares e neoplasia. A criptococose cutânea é facilmente confundida com molusco contagioso, carcinoma de célula basal, carcinoma escamoso e sarcoidose.

### Diagnóstico laboratorial

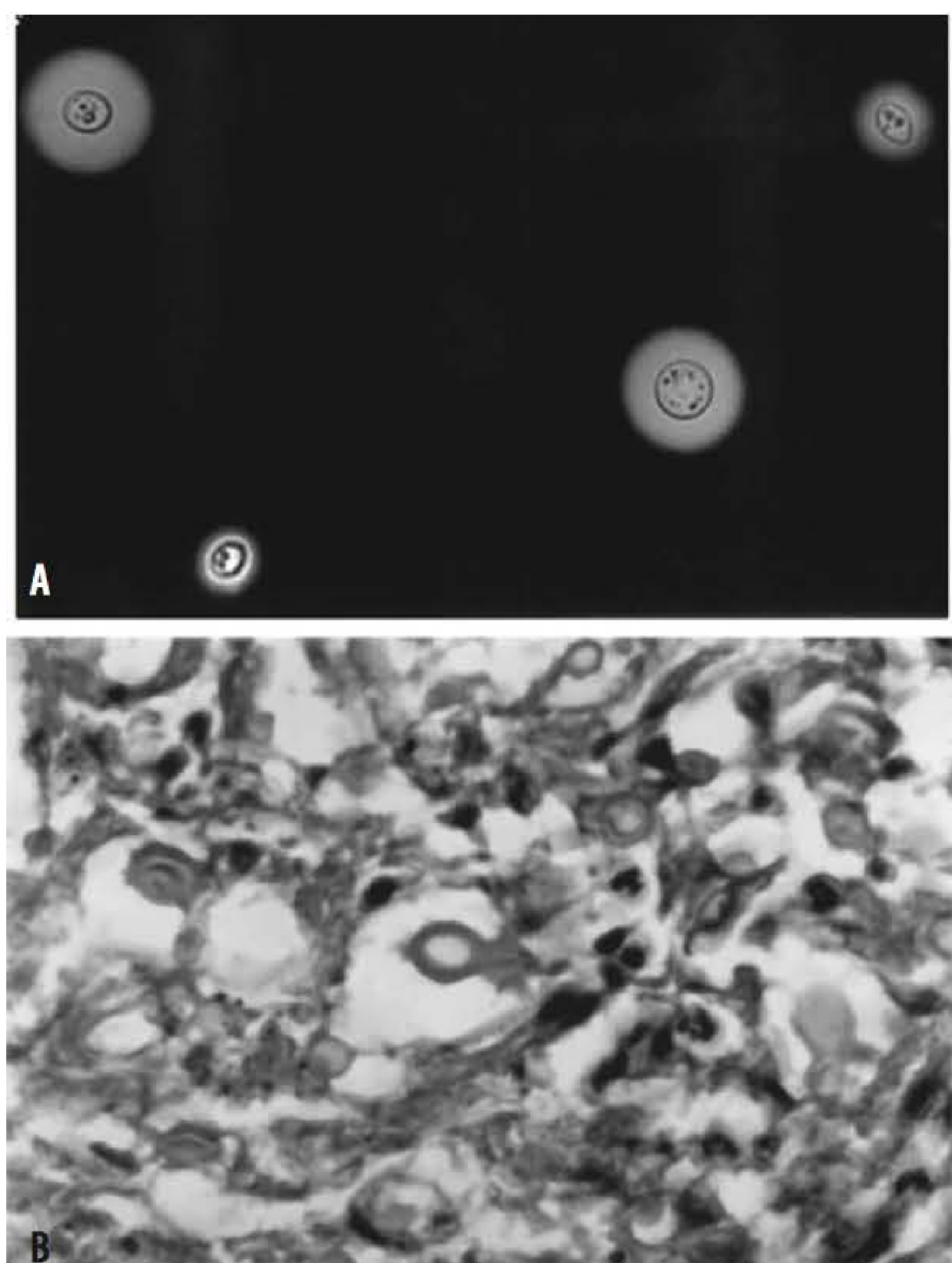
A pesquisa do fungo é realizada em espécimes como líquido cefalorraquidiano (LCR), escarro, lavado brônquico, pus de lesões cutaneomucosas, urina, macerados de tecidos obtidos por biopsia, secreção prostática, sangue e punção de medula óssea.

*Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* caracterizam-se por apresentarem células globosas ou em forma ovalada, com cápsula polissacarídica. As paredes dos blastoconídios são espessas e as células contêm, com frequência, estruturas globosas dispersas no citoplasma, formadas por substâncias refringentes à luz do microscópio.

Muitas vezes, as cápsulas têm tamanho reduzido ou são ausentes. Essas formas são comuns em pacientes imunodeficientes e sob intensa terapia. As formas capsuladas podem ser observadas com facilidade em preparações com tinta da China (Figura 32.24). Os organismos são visualizados por contraste negativo. A tinta da China pode, eventualmente, conter partículas ou estar contaminada com microrganismos que funcionam como artefatos ao exame direto; recomenda-se, portanto, a preparação de lâmina com salina e tinta como controle negativo na execução do exame. Para a visualização de formas acapsuladas recomenda-se o exame direto com corante nigrosina, que confere coloração violácea para contraste dos blastoconídios.

O LCR deve ser centrifugado, e, com as duas primeiras gotas do sedimento, deve-se realizar o exame direto. Com o restante deve ser processada a cultura. O sobrenadante é utilizado para a pesquisa de antígeno solúvel polissacarídico, sem perda de sensibilidade.

Secreções do trato respiratório devem ser tratadas com substâncias mucolíticas (N-acetilcisteína) ou hidróxido de potássio (a 30%) para a eliminação da maioria das células do hospedeiro e outros artefatos. Os blastoconídios são visualizados ao microscópio com luz de baixa intensidade. Os materiais tratados com KOH inviabilizam o fungo para cultura, mas o tratamento com mucolíticos permite o seu



**Figura 32.24** Blastoconídios capsulados compatíveis com *Cryptococcus* sp. **A.** Tinta da China (400 x). **B.** Mucicarmim (1.000 x).



cultivo. Urina se presta também para a pesquisa do fungo com tinta da China, após centrifugação. Não se recomenda a utilização de esfregaços fixados pelo calor para a visualização da levedura, pois esta não é facilmente reconhecível após o processo.

Tecidos obtidos por biopsia ou necropsia devem ser macecados antes do exame direto. Para esses materiais, assim como materiais purulentos, a difusão da tinta da China é dificultada pela alta densidade do material biológico e laboratoristas experientes devem realizar também o exame “a fresco” na pesquisa dos blastoconídios.

A visualização de *Cryptococcus* nos tecidos é facilitada pelo uso de colorações especiais. As células podem ser coradas segundo Gomori, ou pelo método de PAS ou mucicarmim (Figura 32.24). Neste último método, as células capsuladas da levedura são observadas, enquanto, nos outros, as cápsulas não são visíveis. Cadeias curtas de leveduras, que lembram pseudo-hifas, são observadas ocasionalmente. As células da espécie *gattii* apresentam-se nos tecidos nas formas globosa e elipsoide.

Resultado do exame direto positivo: presença de leveduras capsuladas compatíveis com *Cryptococcus* sp.

### Cultura

Espécies de *Cryptococcus* são facilmente isoladas e mantidas em meios de cultura. Ágar Sabouraud, com ou sem clozanfenicol ou meios presuntivos, tais como ágar niger, ágar L-dopa ou dopamina, podem ser usados, dependendo das condições do laboratório. As variedades de *C. neoformans* e *C. gattii* produzem a enzima fenol oxidase, que oxida o ácido cafeico presente no ágar presuntivo, resultando na formação de melanina; assim, o fungo é facilmente diferenciado por apresentar colônias marrons.

Os meios presuntivos são especialmente úteis para a semeadura de materiais biológicos considerados contaminados: secreções do trato respiratório, urina e fezes. Os meios presuntivos não devem conter mais de 0,1% de glicose; meios ricos em glicose retardam ou inibem a formação de pigmento marrom. A maioria das colônias com pigmento marrom e células capsuladas são *C. neoformans*. Algumas cepas de *C. laurentii*, porém, produzem colônias marrons; por outro lado, algumas cepas de *C. neoformans* não apresentam a enzima fenol oxidase e crescem em ágar niger como colônias brancas. Por isso, mesmo colônias brancas em meios presuntivos devem ser submetidas a testes fisiológicos, em particular se no exame direto do espécime ou da cultura forem visualizados blastoconídios com cápsula.

Culturas com resultado falso-negativo podem ocorrer. Algumas vezes, *C. neoformans* não é isolado do liquor devido à presença de substâncias inibidoras ou na vigência de terapia antifúngica. Nesses casos, pode-se inocular 2 a 3 ml em meio líquido de Sabouraud e incubar em estufa com agitação.

Na Figura 32.25 estão representados os procedimentos para o exame micológico do LCR.

Secreções do trato respiratório, pus, urina e material de lesão cutânea devem ser inoculados em ágar Sabouraud ou outro meio, com ou sem antibióticos, mas sem cicloeximida. A maioria dos isolados de *C. neoformans* é sensível à cicloeximida em concentrações de 6 a 16 µg/ml.

A cultura positiva de urina pode indicar criptococose disseminada, mesmo na ausência de sinais clínicos que envolvam o trato urinário, especialmente procedentes de pacientes com

AIDS. No acompanhamento da terapêutica, é indicada a cultura de urina empregando o método da membrana filtrante em meio de ágar niger. Essa metodologia permite a detecção de 1 ufc por litro de urina.

A hemocultura é positiva em cerca de 10% dos casos de criptococose, mas sua utilidade é maior nos pacientes com AIDS ou outras imunodeficiências. O isolamento em meios bifásicos (p. ex., BHI) é mais adequado, apesar de serem recomendados também meios líquidos de cultura adicionados de peróxido de hidrogênio (1 ml/50 ml de meio) ou, ainda, métodos que utilizem lisocentrifugação.

Para o isolamento de *C. neoformans*, as culturas devem ser incubadas a 30 a 32°C; a variedade *neoformans* cresce bem a 37°C e colônias aparecem após 2 a 3 dias; a variedade *gattii* prefere temperaturas de 30 a 32°C e colônias aparecem após 2 dias. Em ágar Sabouraud, ágar extrato de malte, ágar chocolate ou ágar sangue a levedura cresce facilmente, formando colônias brilhantes, viscosas e úmidas de tonalidade creme.

As características microscópicas do gênero *Cryptococcus* incluem ausência de blastoconídios e hifas verdadeiras, incapacidade de fermentar, franca assimilação de inositol e alta produção de urease. São essas as provas básicas para a identificação de gênero.

Na determinação da espécie *gattii* é geralmente utilizado o ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol; em 1 a 5 dias, somente isolados da espécie *gattii* mudam o meio para a cor azul. O aminoácido D-prolina é também utilizado para diferenciar as duas espécies; somente *gattii* utiliza-o como única fonte de nitrogênio e, portanto, pode ser adicionado como fonte de N em auxanogramas. A variedade *grubii* só é diferenciada da var. *neoformans* por métodos de análise de DNA ou por sorotipagem.

Sondas comerciais têm sido desenvolvidas para testes de hibridização de DNA, apresentando excelente especificidade e sensibilidade, porém, essas metodologias ainda não representam uma ferramenta importante no diagnóstico dessa doença. Vários são os protocolos para a reação da PCR na detecção de DNA em espécimes clínicos com suspeita ou detecção presuntiva do agente, mas ainda não se dispõe de métodos de referência que possam ser úteis na prática clínica. As modalidades de PCR *nested*, PCR *multiplex* e PCR em tempo real já foram avaliadas para amostras de LCR. PCR *nested* com dois pares de *primers* baseados na região ITS do DNA ribossômico apresentou especificidade e sensibilidade adequadas, quando aplicada em amostras contaminadas com bactérias. PCR *multiplex* usada para a amplificação de ITS1 e ITS2 de RNA ribossômico permitiu o diagnóstico diferencial entre algumas espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. A amplificação da região 18S do RNA ribossômico também foi realizada por técnica de PCR *nested* e PCR em tempo real, o demonstrando com sucesso o DNA de *C. neoformans* em amostras de tecidos. Entretanto, nenhuma dessas técnicas está disponível ou validada para uso em rotina laboratorial.

No Quadro 32.18 são apresentados os principais aspectos morfológicos e características bioquímicas de espécies de *Cryptococcus* de interesse médico.

### Imunodiagnóstico

No diagnóstico da criptococose é altamente recomendada a pesquisa de antígeno solúvel polissacarídico (glucuroxilo-



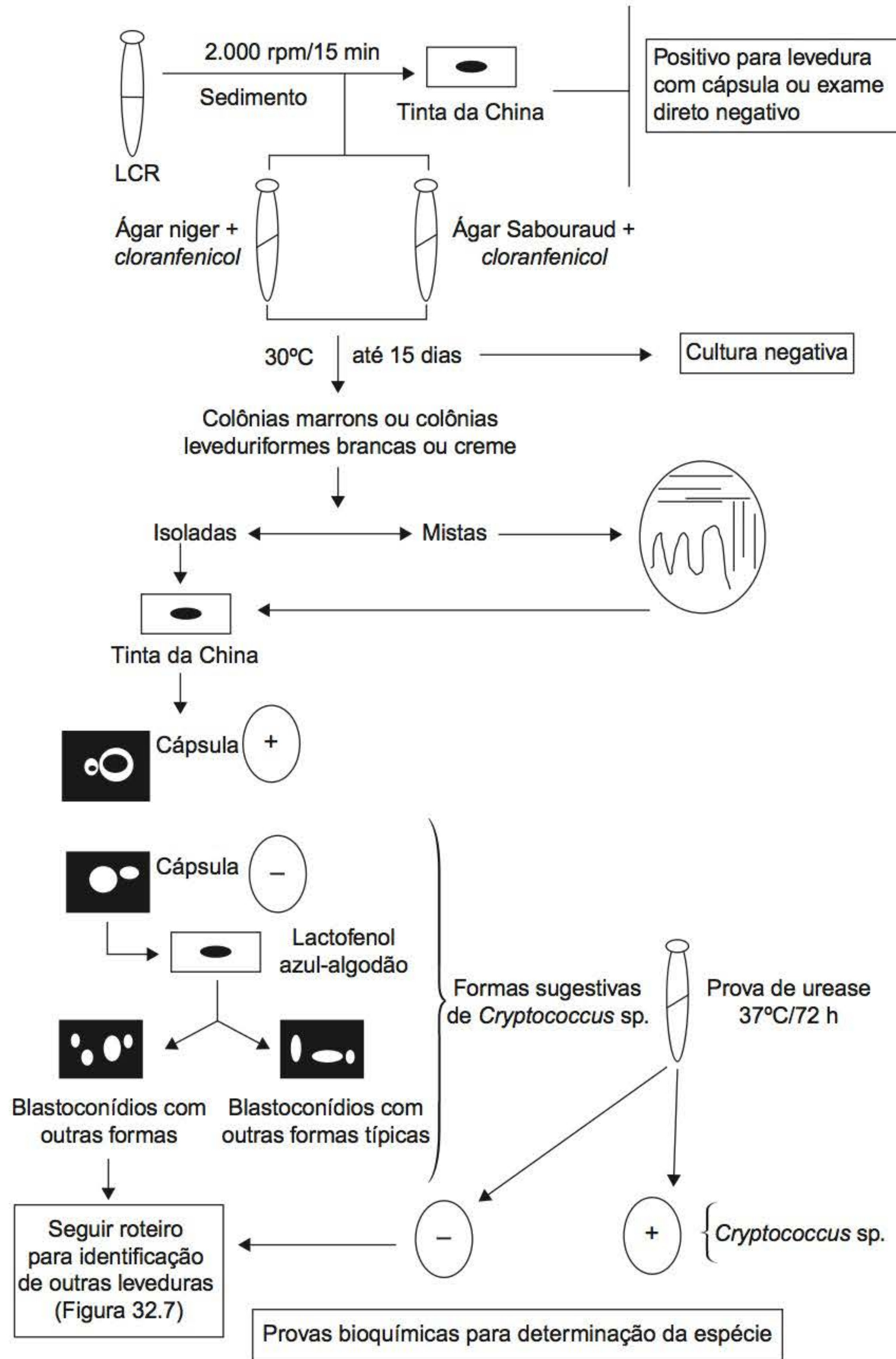


Figura 32.25 Procedimentos para exame micológico de líquido cefalorraquidiano.

Quadro 32.18 - Características fisiológicas e bioquímicas de *Cryptococcus* isoladas de espécimes clínicos.

Espécies	Crescimento a 37°C	Hifas ou pseudo-hifas	Cápsula, tinta da China	Ascosporos	Assimilação													Assimilação de KNO <sub>3</sub>	Fenol oxidase
					Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Celobiose	Inositol	Xilose	Rafinose	Trealose	Dulcitol	Urease		
<i>C. neoformans</i>	+	R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. albidus</i>	-*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. laurentii</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. luteolus</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. terreus</i>	-*	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-*	+	+	-
<i>C. uniguttulatus</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-*	-	+	-	-

\*Variação entre as cepas; R = raro; + = reação positiva; - = reação negativa.



manana), presente na cápsula da levedura. O teste, comercialmente disponível sob forma de *kit*, baseia-se em reação de aglutinação e é de fácil execução. Partículas de látex, revestidas com globulina anti-*C. neoformans*, são aglutinadas diante das mínimas concentrações de antígeno solúvel presente no LCR ou soro. Amostras de urina, lavados e aspirados broncoalveolares demonstraram, mais recentemente, possuir concentrações do antígeno. Os sistemas comercializados podem conter partículas revestidas com anticorpos policlonais ou monoclonais. Existe variabilidade de resultados nos diferentes sistemas, mas a sensibilidade do teste é de 95 a 99%.

Altos títulos de antígeno são correlacionados com gravidade e, da mesma maneira, sua diminuição corresponde a bom prognóstico. Em pacientes com AIDS, os títulos em geral são bastante altos (acima de  $10^4$ ) e não há clara correlação entre a melhora do paciente e a queda dos títulos, principalmente no soro.

Reações falso-positivas podem ocorrer, relacionadas com fator reumatoide, doenças causadas por *Trichosporon beigelii* e bacilos gram-negativos. Para contornar esse problema, alguns sistemas apresentam controles internos para excluir fator reumatoide; outros usam tratamento prévio com enzima pronase com a mesma finalidade.

Testes imunoenzimáticos para pesquisa de antígeno apresentam também alta sensibilidade e especificidade. Os ensaios utilizam sistema de captura policlonal e sistema monoclonal de detecção, não necessitando de tratamento prévio da amostra com enzimas. Essas provas não são, ainda, de amplo uso em laboratórios clínicos.

### Métodos moleculares

Na micologia as características micromorfológicas, bioquímicas e sorológicas de um determinado organismo frequentemente direcionam a identificação do patógeno. Contudo, essas estratégias nem sempre são suficientes para o diagnóstico laboratorial da criptococose. Atualmente, existem sequências gênicas específicas que podem ser usadas para detectar *C. neoformans* e *C. gattii* a partir de espécimes clínicos e culturas. Vários são os protocolos para a reação da PCR na detecção de DNA em espécimes clínicos com suspeita ou detecção presumida do agente, mas ainda não se dispõe de métodos de referência que possam ser úteis na prática clínica. As modalidades de PCR *nested*, PCR *multiplex* e PCR em tempo real já foram avaliadas para amostras de LCR. PCR *nested* com dois pares de *primers* baseados na região ITS do DNA ribossômico apresentou especificidade e sensibilidade adequadas quando aplicada em amostras contaminadas com bactérias. PCR *multiplex* usada para a amplificação de ITS1 e ITS2 de RNA ribossômico permitiu o diagnóstico diferencial entre as espécies de *Cryptococcus*. A amplificação da região 18S do RNA ribossômico também foi realizada por técnica de PCR *nested* e PCR em tempo real, demonstrando com sucesso o DNA de *C. neoformans* em amostras de tecidos.

Essas sequências podem ser usadas para identificação, tipagem e estudo da genética populacional. Dentre as principais técnicas de identificação estão a hibridização, que foi a pioneira na identificação molecular e desenvolvimento de *probes* específicos para a detecção de patógeno, PCR e outros resultantes de modificações da PCR, dos quais podemos citar PCR *nested*, PCR *multiplex*, PCR a partir de iniciadores randômicos (RAPD), PCR associada à análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) e PCR em tempo real. Esta última metodologia citada apresenta maior sensibilidade que os métodos de rotina. Em relação aos métodos de tipagem, os

mais eficientes na diferenciação entre os tipos e os sorotipos são PCR *fingerprinting*, PCR-RFLP, AFLP, MLST e a cariotipagem.

Recentemente, o uso de Luminex® xMAP para a identificação simultânea de espécies fúngicas clinicamente relevantes, inclusive *C. neoformans*, aplicando *probes* baseados em sequências ITS2 (espaço interno transcrito espécie-específico 2) vem levantando perspectivas para a substituição dos métodos moleculares convencionais.

Eventuais fatores de erro com essas metodologias são a possibilidade de resultados falso-positivos, consequentes a contaminação ou ampliação não específica, e resultados falso-negativos decorrentes de questões técnicas relativas à extração do DNA ou má conservação do espécime biológico, o que permite a degradação do DNA. Ferramentas moleculares também possibilitam a identificação de espécies não frequentemente descritas, como *C. laurentii*, e podem fornecer resultados mais compreensivos do que o diagnóstico convencional, enriquecendo o entendimento da epidemiologia e história natural da criptococose.

As principais técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico e à tipagem, as sequências-alvo específicas para a identificação e diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como os resultados de avaliações da sensibilidade e especificidade de publicações se encontram no Quadro 32.19.

### ■ Tricosporonose

Espécies de *Trichosporon* podem causar infecções variadas em seres humanos – como a tricosporonose – em que as manifestações clínicas podem simular candidíase. *Trichosporon* spp. pode causar apenas lesões superficiais (ver Micoses superficiais), e formas disseminadas, aguda e crônica, que são frequentemente fatais em pacientes com doenças malignas subjacentes. Quadros clínicos resistentes à terapia antifúngica tradicional com anfotericina B incluem peritonite, endocardite e meningite; manifestações alérgicas broncopulmonares foram, também, descritas.

*T. cutaneum* (sinônimo de *T. beigelii*) é espécie mais frequente como agente de onicomioses e piedra branca, nome dado à infecção fúngica crônica da cutícula do pelo, descrita originalmente por Beigel em 1865. *Trichosporon* spp. foi reclassificado em 1992, a partir de estudos moleculares, e subdividido em seis espécies de interesse médico: *T. cutaneum*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. mucoides*, *T. ovoides* e *T. inkin*. As duas últimas espécies também estão envolvidas em casos de piedra branca, e as demais espécies são responsáveis por pneumonites, infecções mucosas, endocardites, queratites, hepatites, peritonites etc. Alguns estudos indicam que a resposta ao tratamento, a resistência *in vitro* a antifúngicos e, portanto, o prognóstico do paciente, dependem da espécie envolvida. A identificação do agente, então, pode ter relevância clínica.

*T. asahii* é espécie oportunista, descrita como patógeno emergente em infecções disseminadas e nosocomiais em pacientes de UTI neonatal. O quadro clínico da infecção por este microrganismo é inespecífico e de muito mau prognóstico. As causas de infecção por esta levedura estão relacionadas com o uso de antibióticos de amplo espectro, uso de corticosteroides, parto vaginal, nutrição parenteral e uso prolongado de cateter.

Diversos estudos demonstram a baixa sensibilidade *in vitro* de *T. asahii* a antifúngicos comumente utilizados, como anfotericina B e fármacos triazólicos. Além disso, algumas cepas são resistentes à 5-fluorocitosina. A administração precoce de



**Quadro 32.19 - Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico e à tipagem, sequências-alvos específicas para a identificação e diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii*.**

	Técnica	Alvos	Vantagens	Desvantagens	Referência
Identificação	Hibridização	DNA polimórfico e repetitivo	Alta sensibilidade e especificidade	Alto custo e trabalhoso	Spitzer and Spitzer, 1992
	PCR <i>nested</i>	ITS rDNA	Alta sensibilidade e especificidade	Presença de contaminantes na reação	Rappelli <i>et al.</i> , 1998
	AFLP Eco RI e Mse	DNA/duas etapas	Deteção de variabilidade genética	Grande número de fases, muitos reagentes, qualidade do DNA	Boekhout <i>et al.</i> 2001
	PCR-RFLP	Urease	Especificidade; fase da hibridização pode ser ignorada	Sensibilidade diminuída em caso de mutações isoladas	Meyer <i>et al.</i> , 2003
	PCR	ITS e 5.6S rRNA	Alta sensibilidade e especificidade; rapidez e viabilidade	Presença de contaminantes na extração e fases da reação	Paschoal <i>et al.</i> , 2004
	PCR <i>fingerprinting</i>	Microsatélite (GACA) <sub>4</sub>	Não é necessário conhecimento prévio das sequências-alvo; uso de <i>primers</i> pequenos; detecção de polimorfismo	Padronização da técnica de acordo com as condições de cada laboratório	Hafner <i>et al.</i> , 2005
	AFLP	Cápsula	Alta sensibilidade e especificidade; alta resolução e poder de amostragem; detecção de variabilidade genética	Maior número de fases; maior número de reagentes; alto custo	Enache-Angoulvant <i>et al.</i> , 2007
	Cariótipo/RAPD	DNA cromossômico Minissatélite repetitivo	Não é necessário conhecimento prévio das sequências-alvo; uso de <i>primers</i> pequenos; detecção de polimorfismo	Padronização da técnica de acordo com as condições de cada laboratório	Almeida <i>et al.</i> , 2007
	PCR <i>multiplex</i>	Sorotipo específico	Amplificação de 2 ou mais <i>loci</i> em apenas 1 reação; baixa quantidade de DNA extraído	Interferência devido ao polimorfismo; competição de reagentes; possibilidade de produtos não específicos	Leal <i>et al.</i> , 2008
	<i>Real-time</i> PCR	18S/28 rRNA	Alta sensibilidade e especificidade; detecção de níveis de expressão genética; rapidez	Interferência na análise final devido à contaminação com DNA genômico; requer habilidade técnica e suporte; alto custo	Levy <i>et al.</i> , 2008
	RAPD	Minissatélite (M13)	Não é necessário conhecimento prévio das sequências-alvo; uso de <i>primers</i> pequenos; detecção de polimorfismo	Padronização da técnica de acordo com as condições de cada laboratório	Capoor <i>et al.</i> , 2008
	MLST	IGS, cápsula, lacase, urease, fosfolipase	Reprodutível e não ambíguo; análise completamente automatizada; análise simultânea de múltiplos <i>loci</i>	Limitações na diferenciação de cepas quando os genes estão muito conservados	Chen <i>et al.</i> , 2008

Adaptado parcialmente de Sidrim *et al.*, 2010.

anfotericina B pode favorecer o prognóstico e melhorar a evolução clínica. Entretanto, quando os pacientes são recém-nascidos, pode haver resistência *in vivo* a essa substância, o que explica as altas taxas de mortalidade nessa população. Além disso, alguns estudos comprovaram a formação de biofilme por *Trichosporon* spp., que promove a persistência da infecção mesmo para cepas sensíveis à terapia antifúngica.

As medicações antifúngicas mais novas, embora promissoras em relação ao tratamento de infecções fúngicas agressivas e resistentes em adultos e crianças, não têm sido estudadas em recém-nascidos. Esse é o caso da caspofungina, medicamento ativo contra espécies de *Candida* spp., mas não contra *Trichosporon* spp. A combinação de caspofungina e anfotericina B, ou com um antifúngico triazólico, pode aumentar a eficácia clínica. A identificação precoce do fungo a partir de espécimes clínicos deveria estabelecer a comunicação urgente entre os profissionais da UTI, a fim de serem providenciadas novas coletas de materiais para culturas adicionais, teste de sensibilidade e início imediato do tratamento. O sucesso da terapia depende, também, da retirada dos cateteres de inserção profunda e do manejo adequado da neutropenia, quando for o caso. A frequência, cada vez mais acentuada, de recém-nascidos em UTI e a probabilidade de colonização, seguida de infecção por esses agentes etiológicos, requerem atenção redobrada por parte dos médicos assistentes no diagnóstico e tratamento das síndromes sépticas.

### Exame direto e identificação dos agentes etiológicos

Para o isolamento e identificação da espécie, diversos espécimes clínicos, como raspados cutâneos, tecidos obtidos por biopsias, pelos, sangue e urina podem ser utilizados. O diagnóstico laboratorial da tricosporonose inicia-se pelo exame microscópico da amostra biológica “a fresco”, com o uso de KOH ou corada segundo Gram, com exceção de amostra de sangue, para o qual o exame direto tem baixa sensibilidade. A morfologia de *Trichosporon* caracteriza-se por apresentar hifas septadas e artroconídios, além de blastoconídios. Para todas as amostras biológicas é indicado o isolamento do agente em meios de cultura. A cultura é, facilmente, obtida em 48 h a 72 h, sob temperatura de 25 a 37°C em ágar Sabouraud, com cloranfenicol, ou meios para hemocultura no caso de amostras de sangue. Para a identificação fenotípica da espécie são utilizadas provas fisiológicas, como assimilação e fermentação de fontes de carbono e nitrogênio, mas a confirmação é realizada por análise molecular.

### Métodos moleculares

A investigação molecular por métodos fundamentados na PCR, utilizando iniciadores espécie-específicos, foi recentemente desenvolvida com o objectivo de aplicar uma tecnologia mais simples, específica e rápida para o diagnóstico. A região do espaçador interno transcrito (ITS2), que é altamente variável entre os genomas de cada espécie de *Trichosporon*, tem sido



utilizada para gerar sondas de hibridização de oligonucleotídeos para a identificação específica. Atualmente, para fornecer sensibilidade adequada para a aplicação clínica, a amplificação da região ITS2 é feita por PCR *seminested*, antes da hibridização dos produtos amplificados, para gerar um painel de teste usando a tecnologia comercialmente disponível denominada Luminex®.

A técnica de amplificação do material genético utilizando sequências iniciadoras aleatórias, como DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), foi utilizada para determinar a diversidade intraespecífica de *T. asahii*, associando-se as sequências OPAO-15 e 1821 e resultando na obtenção de cinco e três padrões eletroforéticos, respectivamente. Essa técnica é uma ferramenta útil para a investigação epidemiológica das fontes prováveis de infecção, pois permite a identificação de subtipos moleculares dentro de uma única espécie.

▪ Outras leveduroses

*Rhodotorula* sp., levedura que compõe a flora normal da pele, vive saprofiticamente em variados nichos ambientais. No entanto, seu caráter oportunista permite que, sob certas condições predisponentes, cause infecções como peritonite, pneumonia, septicemia, meningite e endocardite, frequentemente relacionadas com o uso de cateter intravenoso. A participação da levedura na etiologia do processo infeccioso só pode ser definida após a verificação de critérios inerentes às micoses oportunistas:

- Demonstração do agente no exame direto do espécime clínico
- Isolamento repetido de cultura pura do mesmo agente
- Comprovação da invasão do fungo no tecido do hospedeiro.

A identificação de *Rhodotorula* sp. é relativamente fácil, pois ela produz pigmentos carotenoides, que conferem cor salmão-

laranja às culturas. Deve ser diferenciada de *Cryptococcus* sp., já que ambos os gêneros apresentam características fisiológicas comuns, como produção de urease, incapacidade fermentativa, blastoconídios esféricos ou ovais e cápsula. *Rhodotorula* pode ser distinguida de *Cryptococcus* sp. pela inabilidade de assimilar inositol e pela alta produção de pigmentos carotenoides.

Espécies do gênero *Pichia* (*Hansenula*) produzem infecção humana. *P. anomala* desenvolveu episódios de infecção hospitalar em pacientes submetidos a cateter intravascular. *P. angusta* (*H. polymorpha*) foi isolada de linfonodos do mediastino de crianças com doença granulomatosa crônica. A cultura do material biológico dos casos suspeitos desta levedurose é feita em ágar Sabouraud. Em 1 semana, surgem colônias de leveduras de cor branco-creme de textura variada, lisa ou rugosa. Ao microscópio são observadas leveduras com brotos multilaterais, em geral com hifas ou pseudo-hifas. Os ascósporos, em forma de chapéu do tipo elmo, e a assimilação de nitrato sugerem o diagnóstico do gênero. Assimilação e fermentação de carboidratos são necessárias à sua identificação específica.

Conforme descrito em Micoses superficiais, a levedura *Malassezia furfur* é o agente da pitiríase versicolor. A natureza lipofílica dessa levedura permite que ela se desenvolva em soluções ricas em lipídios, amplamente utilizadas em hospitais. Desse modo, no ambiente nosocomial, essa levedura pode se multiplicar em soluções de alimentação parenteral que contenham esses nutrientes. Pacientes sob esse regime podem apresentar febre devido à infecção de corrente sanguínea causada por essa levedura. Infecções como pneumonia e peritonite são exemplos de manifestações clínicas após fungemia. A suspensão da fonte de contaminação, em regra solução hiperlipêmica, resulta em regressão do quadro, mas, eventualmente, há necessidade de terapia antifúngica. Para o isolamento da levedura é necessária a adição de azeite de oliva ao meio de Sabouraud e incubação a 35 a 37°C. No caso de fungemia, hemoculturas

Quadro 32.20 ▪ Características morfológicas e bioquímicas de algumas leveduras de interesse médico.

Gêneros e espécies	Assimilação																	Fermentação									
	Crescimento a 37°C	Película em meio líquido	Hifas e pseudo-hifas	Cápsulas	Ascósporos	Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Celobiose	Inositol	Xilose	Rafinose	Trealose	Dulcitol	Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Trealose	Urease	Assimilação de KNO <sub>3</sub>	Fenoloxidase	
<i>Rhodotorula glutinus</i>	+	-	-	-*	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
<i>R. rubra</i>	+	-	-	-*	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-*	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	
<i>P. anomala</i>	+	-*	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	
<i>P. angusta</i>	+	-*	-	-	+	+	+	+	-	-	-	v	-	v	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
<i>Geotrichum candidum</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\*Variação entre cepas; + = reação positiva; - = reação negativa.



deverão ser realizadas. As colônias cremosas mostram pequenos blastoconídios com brotamento em base larga.

*Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies são amplamente utilizadas em indústrias alimentícias e de bebidas. Indivíduos expostos podem portar essas leveduras na flora normal, ou transiente, do trato gastrointestinal. Porém, o potencial patogênico dessas espécies em pacientes imunocomprometidos foi demonstrado em vários casos bem descritos na literatura especializada. Infecções de corrente sanguínea, orofaringe e mucosa de estômago foram descritas. Na Europa, *S. cerevisiae* causa infecções pulmonares em padeiros. Em várias partes do mundo são descritos quadros de vulvovaginite causada por cepas resistentes aos antifúngicos. No tecido do hospedeiro, *Saccharomyces* sp. é semelhante a *Candida* sp. A identificação de gênero e da espécie segue a orientação descrita para leveduras, apoiando-se em aspectos micromorfológicos e características fisiológicas. A formação de ascósporos é típica do gênero *Saccharomyces* e constitui requisito para sua classificação. No Quadro 32.20 são apresentadas as características morfológicas e bioquímicas de algumas leveduras de interesse médico.

## ► Fungos dimórficos causadores de micoses sistêmicas

Fungos dimórficos têm capacidade de crescer na forma de bolor a temperaturas entre 25 e 30°C e na forma de levedura (ou esférula) em meios enriquecidos ou tecidos do hospedeiro a 37°C.

Os fungos dimórficos capazes de causar micoses sistêmicas de forma endêmica são *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, *Blastomyces dermatitidis* e o complexo *Coccidioides immitis/posadasii*. Estas duas últimas espécies são morfologicamente idênticas, mas genética e epidemiologicamente distintas. Fenotipicamente, *C. posadasii* difere de *C. immitis* por crescer mais lentamente em meio com altas concentrações de sal.

Esses fungos dimórficos também são chamados de patógenos sistêmicos ou primários. Eles produzem hifas hialinas septadas e ramificadas, em cultivos a 25°C e, à temperatura de 37°C ou em tecidos, convertem-se em células arredondadas brotantes. *P. brasiliensis* e *B. dermatitidis* não requerem nutrientes especiais e se convertem para a fase leveduriforme apenas com elevação de temperatura (37°C). *H. capsulatum* requer, além da temperatura alta, condição nutricional de redução, como grupos tióis da cisteína. A conversão de *C. immitis/posadasii*, de filamentoso (hifas com artroconídios) para fase leveduriforme (esférula), é mais difícil, necessitando, além de elevação de temperatura, atmosfera de CO<sub>2</sub> e nutrientes. Culturas de *C. immitis/posadasii* representam grave risco biológico para o pessoal do laboratório e devem ser manuseadas com extremo cuidado em condições de biossegurança de laboratório de nível 3.

Os fungos dimórficos causadores de micoses sistêmicas são classificados na classe dos deuteromicetos. *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *C. posadasii* designam as formas anamorfas (estágio assexuado) destes fungos. Os estágios sexuais de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* são classificados na ordem Onygenales, da subdivisão Ascomycotina. As formas teleomórficas de *C. immitis* e *P. brasiliensis* são desconhecidas.

Em meios rotineiros de laboratório, à temperatura de 25°C a 30°C, essas espécies geralmente crescem como bolores e produzem colônias sem características próprias, podendo ser confundidas com outras espécies saprobióticas de fungos. A maior diferença está na velocidade de crescimento, pois colônias de fungos dimórficos desenvolvem-se mais lentamente.

Outros fungos podem apresentar dimorfismo, como *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffei*, *C. albicans*, *Wangiella dermatitidis* e outros, que sofrem transformações morfológicas, espontaneamente ou de forma induzida.

## ■ Paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana)

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica de caráter endêmico que acomete trabalhadores rurais, principalmente do sexo masculino. Manifestações polimórficas são observadas com frequência. A doença é caracterizada por infecção pulmonar primária frequentemente inaparente que pode se disseminar, formando lesões ulceradas na mucosa bucal e, ocasionalmente, na mucosa gastrointestinal. Os linfonodos são comumente envolvidos e algumas vezes há extensão para tecidos cutâneos ou envolvimento de vários órgãos. As manifestações clínicas da PCM são bastante variadas, pois podem comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema e, por esse motivo, simular outras doenças. Os órgãos mais comprometidos são pulmões, pele, mucosa das vias aerodigestivas superiores, tubo digestivo, suprarrenais e linfonodos. A PCM se apresenta sob duas formas clínicas progressivas principais, isto é, a forma aguda/subaguda e a forma crônica. Por outro lado, também se observa a forma residual, referida como sequestrar, com comprometimento pulmonar, suprarrenal, laríngeo, digestivo, encefálico ou medular e, por fim, tegumentar.

*Paracoccidioides brasiliensis* abriga os grupos filogenéticos S1, PS2, PS3 e Pb01 similares. Este último é descrito como uma nova espécie *P. lutzii* (isolado Pb01 similares). Ambos são dimórficos e apresentam características morfológicas e de patogenia semelhantes. As formas típicas do fungo na fase leveduriforme (fase L) são células globosas, de contorno duplo e parede espessa, e inclusões citoplasmáticas, que formam cadeias curtas de blastoconídios. Os brotamentos múltiplos, especialmente em tecidos, podem se assemelhar a uma “roda de timão” e assumem tamanhos e formas diversas.

Esta doença é restrita à América Latina, ocorrendo desde o México até a Argentina, com exceção de poucos países. Sua distribuição é heterogênea, com áreas de baixa e alta endemicidade. Maior número de casos ocorre no Brasil, Colômbia e Venezuela. Casos da doença foram descritos em países da Europa, EUA, África e Ásia; os pacientes adquiriram a infecção quando moraram na América Latina. As áreas com maior prevalência no Brasil são os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Minas Gerais. A PCM tem sido diagnosticada em todas as Regiões do Brasil, mas predomina no Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país. Esses dados, no entanto, sofrem a influência das migrações, pois muitos agricultores que se infectaram em áreas de grande prevalência da PCM adoeceram, anos depois, em outras regiões. A doença acomete indivíduos em sua fase mais produtiva, é considerada doença profissional, seu tempo de tratamento é longo e apresenta reativações e sequelas em grande parte dos pacientes. Todos esses fatores determinam elevado custo econômico e social. O diagnóstico precoce da paracoccidioidomicose é importante, a fim de evitar as formas mais avançadas e muti-



lantes da doença, pois as lesões pulmonares produzidas pelo fungo têm tendência evolutiva, determinando fibrose residual. Além disso, com o processo de envelhecimento, a sintomatologia respiratória e o declínio da função pulmonar tendem a piorar gradativamente.

A doença é confinada às áreas geográficas com verões úmidos e quentes e com invernos secos, temperaturas médias entre 14 e 30°C e solos ácidos e ricos. Este fungo foi esporadicamente isolado do solo e de tatus capturados nos estados do Pará e São Paulo. Foi isolado também de rações de animais provavelmente contaminadas com solo. O fungo, na fase filamentosa (fase M – miceliar), produz propágulos facilmente destacáveis e suficientemente pequenos para atingir os espaços alveolares. A principal porta de entrada do fungo é a via respiratória, embora, no passado, se acreditasse no papel da via cutânea por meio de trauma, principalmente na região bucal, devido ao hábito de limpar os dentes com fragmentos de plantas.

A doença é apontada como a 8ª causa de morte no Brasil, considerando as doenças infecciosas e parasitárias, predominantemente crônicas. Ela é mais frequente em agricultores; ocorre principalmente em adultos do sexo masculino, em idade entre 30 e 50 anos (80 a 90% dos pacientes são homens), embora tenham sido relatados casos em crianças com menos de 10 anos e em idosos. Essas taxas diminuem em pacientes com menos de 30 anos e em crianças, faixas etárias em que ambos os sexos são igualmente afetados. A predominância no sexo masculino pode ser explicada pelo efeito inibitório dos estrógenos na transformação do fungo da fase M para L.

Todas as raças são suscetíveis; fatores genéticos podem estar associados, bem como má nutrição e alcoolismo. A doença não tem contágio inter-humano. Infecção assintomática (paracoccidioidite) causada por *P. brasiliensis* ocorre em indivíduos normais que vivem em áreas endêmicas e têm reação intradérmica positiva à paracoccidioidina. O contágio ocorre precocemente, com pico de incidência entre 15 e 19 anos. A resposta positiva ao teste é idêntica entre os sexos. Estima-se que 10% das populações do Brasil, Colômbia e Venezuela sejam infectadas.

### Diagnóstico diferencial

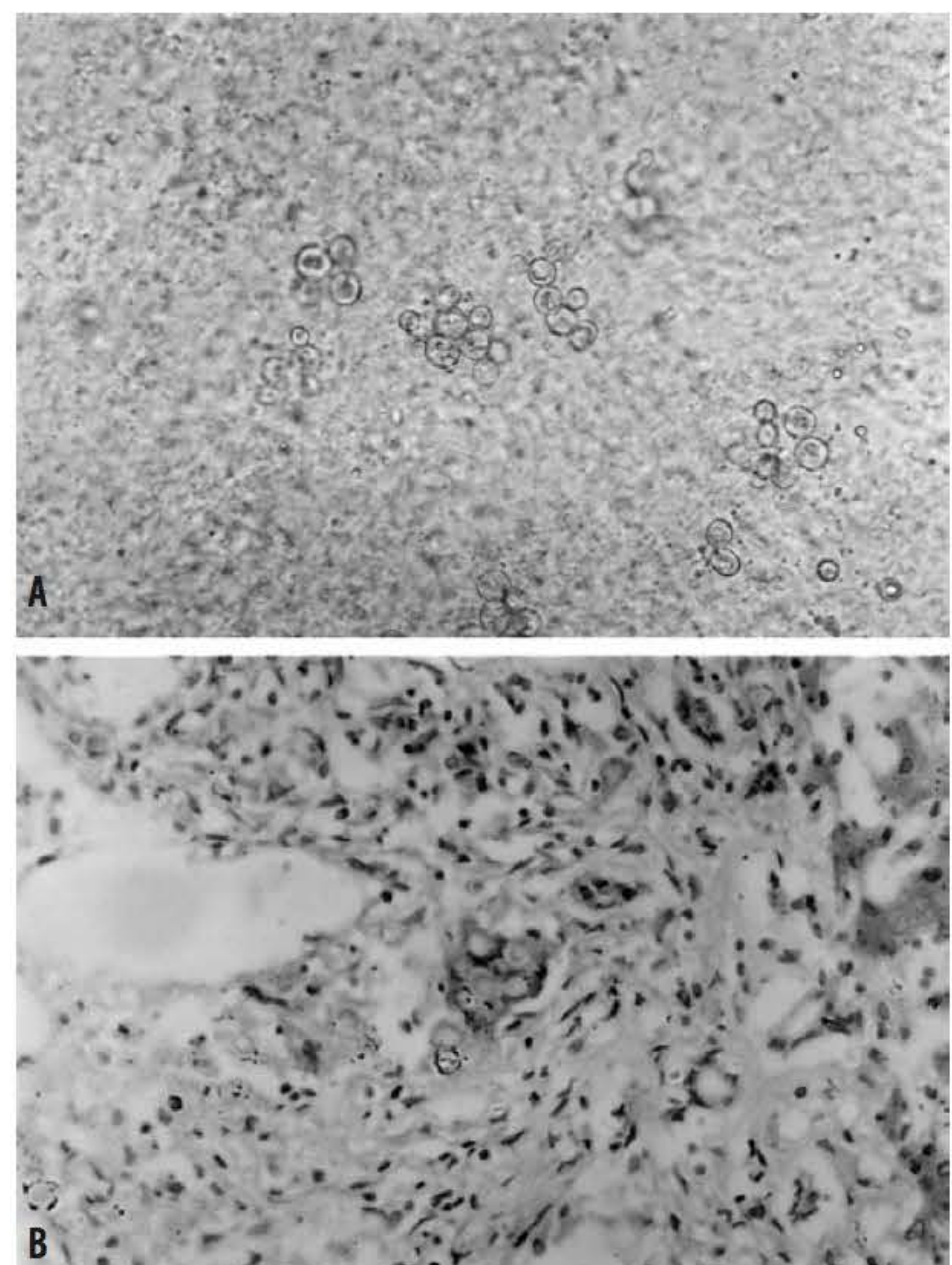
A paracoccidioidomicose, principalmente na sua forma pulmonar, deve ser diferenciada de outras micoses e de tuberculose. Os achados clínicos e radiológicos são inespecíficos; no entanto, calcificação extensa, efusão pleural e localização apical são mais indicativas de histoplasmose e tuberculose. Foram descritos casos com tuberculose, paracoccidioidomicose e histoplasmose concomitantemente. A leishmaniose mucocutânea é endêmica e coincidente em muitas áreas da paracoccidioidomicose. As lesões bucais, cutâneas e de fossas nasais são semelhantes. O envolvimento dos linfáticos simula doença de Hodgkin e outras doenças malignas. As lesões vegetativas ulceradas sugerem cromoblastomicose e esporotricose. Casos avançados podem simular tuberculose sistêmica e leishmaniose visceral.

### Diagnóstico laboratorial

Os espécimes clínicos para pesquisa do fungo dependem do sítio topográfico envolvido, mas em geral são escarro, lavado brônquico, lavado broncoalveolar; secreções ganglionares, nasais, cutâneas e oculares, raspado e crostas de lesões ulceradas, fragmentos de tecidos (biopsias cutâneas, de órgãos internos e de ossos), urina, LRC e sangue. As amostras biológicas mais comuns, na prática, são as de trato respiratório, gânglios, lesões cutâneas e mucosas, que devem ser coletadas

segundo a localização da doença. As amostras de trato respiratório (escarro, aspirado, lavado e escovado brônquicos e lavado broncoalveolar) devem ser processadas rapidamente ou armazenadas a 4°C (geladeira), para evitar o crescimento de microrganismos contaminantes. O material deve ser submetido ao exame direto, que apresenta boa sensibilidade. Se o espécime clínico for denso, pode-se colocar uma gota de hidróxido de potássio (KOH) a 10 a 20% para clarificação. Tecidos devem ser macerados e clarificados do mesmo modo. Materiais que contenham muco devem ser tratados com substâncias mucolíticas (N-acetilcisteína, 0,25 g, dissolvida em 25 ml de solução de citrato 0,1 M, a 2,94%, em água destilada em frasco escuro). Após o processamento, o material deve ser centrifugado para concentração e o sedimento, submetido ao exame direto “a fresco”. Não se recomenda a coloração para exame direto de materiais biológicos, com exceção de tecidos obtidos por biopsia. Deve-se lembrar que KOH inativa o fungo, inviabilizando o seu isolamento a partir do material biológico tratado.

Em material de punção ganglionar, formas do fungo são abundantes: células globosas, ovais ou elípticas com 5 a 25 µm de diâmetro, inclusões citoplasmáticas e multibrotamentos com parede de duplo contorno refringente (Figura 32.26A). Algumas vezes, podem ocorrer cadeias de 3 a 4 células. Em outros espécimes biológicos, como raspados de lesões bucais, podem ser observadas formas únicas, pequenas, com parede espessa e refringente. Ocasionalmente, *P. brasiliensis* apresenta-se em formas diminutas (3 a 5 µm), com um único brotamento, e de difícil diferenciação com outras espécies fúngicas. Neste caso, recomenda-se o diagnóstico diferencial entre *Candida albicans* (células menores, parede delgada apresentando ausência de birrefringência ou inclusões), *Cryptococcus* spp. (células menores, uniformes, redondas acapsuladas,



**Figura 32.26** Blastocónidios compatíveis com *Paracoccidioides brasiliensis*: **A.** KOH (400 ×). **B.** HE (1.000 ×).



ausência de brotamento) e *H. capsulatum* (pequenas leveduras ovaladas no interior de células macrofágicas).

Em material histopatológico, células fúngicas podem ser mais bem observadas em colorações de impregnação pela prata ou PAS do que sob coloração de hematoxilina-eosina (Figura 32.26B), especialmente quando as células típicas multibrotantes estão localizadas em granulomas. Estes são formados por células gigantes multinucleadas e células epitelioides, cujo centro contém uma ou mais células fúngicas em contato com leucócitos polimorfonucleares. Muitas células apresentam-se únicas ou com um único broto. As células com brotamento múltiplo são esféricas e comumente medem de 10 a 20 µm de diâmetro. Os brotos, esféricos ou em forma de limão, ficam dispostos ao redor da célula-mãe, conectados por pontes estreitas.

Caso o exame seja negativo, três coletas diárias ou em dias alternados deverão ser realizadas, para confirmar o resultado. Resultado de exame direto positivo: presença de formas leveduriformes com multibrotamento, compatíveis com *Paracoccidioides brasiliensis*.

### Cultura

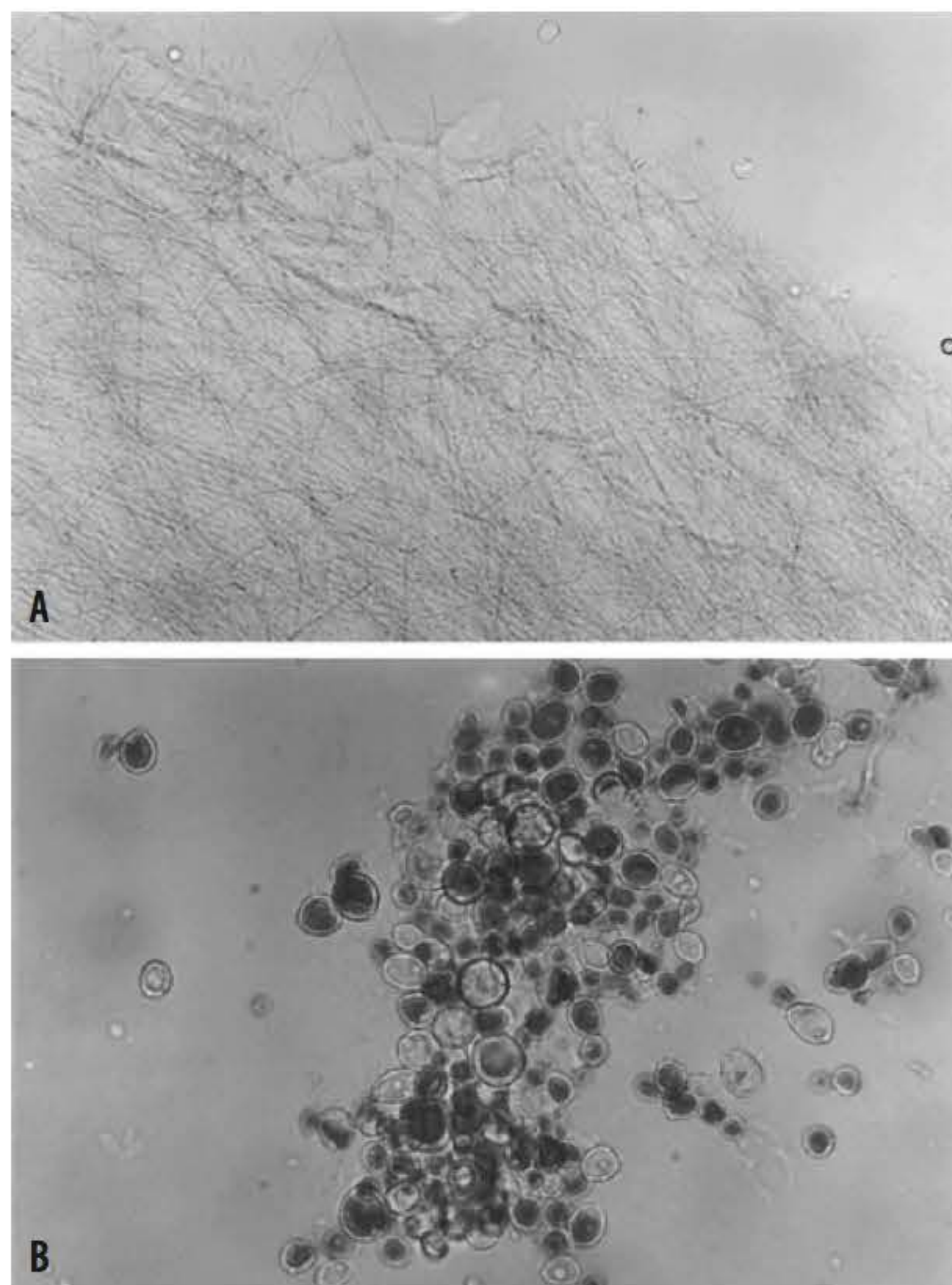
Estão disponíveis vários meios para o isolamento do agente, sendo recomendado o uso de meios enriquecidos com 15% de extrato de levedura, contendo cloranfenicol e cicloeximida ou ainda ágar BHI (infusão cérebro-coração) e ágar extrato de levedura fosfato + NH<sub>4</sub>OH. O material é semeado em tubos e incubado a 25 a 30°C. Todos os meios devem conter cloranfenicol (250 mg/ℓ) e preferencialmente cicloeximida (400 mg/ℓ) para inibir, respectivamente, contaminação bacteriana ou crescimento de fungos anemófilos. Nessa faixa de temperatura o fungo cresce na fase miceliar, lentamente, e surgem colônias brancas ou amarronzadas, cotonosas ou glabrasas em 15 a 20 dias. Ao microscópio, podem ser visualizadas hifas hialinas septadas, com clamidoconídios intercalares ou terminais, com ou sem conídios. Quando presentes, os microconídios aparecem lateralmente ao longo das hifas; artroconídios retangulares podem, também, ser produzidos.

Para o diagnóstico definitivo é obrigatória a conversão da cultura da fase M para a leveduriforme, em que aparecem as formas típicas do fungo. Para tanto, pode-se usar ágar BHI, ágar SABHI (infusão de cérebro bovino, 100 g, infusão de coração bovino, 125 g, proteose peptona, 5 g, glicose, 21 g, NaCl, 2,5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,25 g, ágar, 14 g, água destilada q.s.p., 1.000 mL; pH final, 6,7), meio de Kelley com hemoglobina ou ágar Fava Netto com incubação de 35 a 37°C. A colônia da fase L apresenta-se com aspecto cerebriforme, enrugada, friável, branca a bege. Ao microscópio, células multibrotantes são observadas, similares às de tecido (Figura 32.27).

Outro método para a rápida identificação do fungo na fase miceliar é a pesquisa do exoantígeno característico e/ou métodos moleculares.

### Imunodiagnóstico

Antígenos e testes sorológicos variados são empregados para auxiliar o diagnóstico da micose. Testes sorológicos como imunodifusão dupla (ID), contraímuno eletroforese (CIE), ELISA e *immunoblotting* constituem, na prática, as mais importantes dessas técnicas auxiliares. O filtrado de cultura da fase leveduriforme é usado mais frequentemente no teste de imunodifusão em gel de ágar ou em contraímuno eletroforese. O isolado Pb 339 é o mais empregado na obtenção desse tipo de antígeno. No entanto, recentemente foram descritos casos em que Pb01-like foi isolado e verificou-se pouca reatividade dos soros desses pacientes a esse antígeno.



**Figura 32.27** *Paracoccidioides brasiliensis*: **A.** Forma miceliar. **B.** Forma leveduriforme (400 ×).

A sensibilidade das reações varia em torno de 80 a 95%. Em imunodifusão dupla podem ser detectados até três sistemas precipitantes, sendo mais comum o aparecimento da chamada banda 1 (próxima ao orifício do antígeno). Essa banda é idêntica ao antígeno E<sub>2</sub> e/ou fração “gp 43”. Existem testes mais sensíveis, e os mais usados são ELISA e imunoblot. Recomenda-se a triagem dos soros pelo teste ELISA e, nos casos de resultado negativo, a repetição do teste após 30 dias. Após este período e com persistência de resultado sorológico negativo, descarta-se a possibilidade de PCM. Nos casos de sorologia positiva, realiza-se a técnica de imunodifusão dupla semiquantitativa e/ou contraímuno eletroforese (CIE). Nos casos em que a imunodifusão dupla e/ou CIE for negativa, recomenda-se a realização do ensaio de *immunoblot* para confirmação do diagnóstico sorológico. Por esta metodologia, pode-se detectar mais precocemente anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*.

Os métodos sorológicos são utilizados também no acompanhamento da terapêutica, pois podem indicar, precocemente, recidivas. Os testes são usados, em conjunto com outros indicadores, no controle de cura. Para isso são realizadas titulações semiquantitativas de anticorpos, pelos testes de imunodifusão dupla, contraímuno eletroforese, ou ELISA. Com a melhora clínica, ocorre a queda no título de anticorpos específicos. Mais recentemente foi verificada presença de antígenos específicos na circulação, principalmente, gp 43, que permite diagnóstico precoce presuntivo e pode representar melhora clínica. Esta fração pode ser detectada também na urina de pacientes com doença ativa.

Um dos grandes problemas clínicos na paracoccidioidomicose é o estabelecimento de critérios de cura. O uso de



testes sorológicos sensíveis combinados com exame micológico negativo e melhora clínica podem ser bons parâmetros de cura. Por outro lado, a detecção de antígeno e anticorpos específicos na circulação são os primeiros sinais de recaída. O monitoramento dos pacientes deve ser realizado com métodos sensíveis. Neste sentido, tem-se desenvolvido métodos como *immunoblot* para detecção de anticorpos específicos e pesquisa de antígeno na circulação pelo método de ELISA competitivo. No seguimento dos pacientes são usadas as provas de IDD e CIE semiquantitativa. No critério de cura desta doença também se utiliza o resultado sorológico, que deve ser negativo e/ou apresentar títulos menores que 1:2 em avaliações consecutivas. Pacientes imunossuprimidos com doença associada a PCM podem apresentar resultado sorológico negativo.

### Métodos moleculares

A presença de *P. brasiliensis* pode ser detectada, com finalidade diagnóstica, com sensibilidade e especificidade alta, por meio da técnica de PCR ou suas variantes. Dentre as principais técnicas resultantes de modificações da PCR, podemos citar: RT-PCR, PCR *nested*, PCR *multiplex*, PCR a partir de iniciadores randômicos (RAPD), PCR associada à análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) e PCR em tempo real. Essa metodologia apresenta maior sensibilidade que os métodos de rotina. Várias sequências de DNA de *P. brasiliensis* de uso potencial no diagnóstico foram relatadas, mas poucas foram aplicadas em amostras clínicas. As sequências PC2 (5' ATA GAG GGA GAG CCA TAT GTA CAA GGT 3') e PC6 (5' GGC TCC TCA AAG TCT GCC ATG AGG AAG 3') de GP 43 foram empregadas em amostras de escarro de pacientes com paracoccidioidomicose. Banda de 600 pb (PC2-PC6) específica para *P. brasiliensis* foi demonstrada, porém algumas sequências da gp43 podem sofrer substituições e, assim, há necessidade de maior aplicação delas para verificar a sua universalidade e especificidade. Esta metodologia também foi aplicada para amostras parafinadas e tem mostrado resultados promissores.

Outros iniciadores, como os da sequência MG2(1)F, 5'-GGGATTCCCTAGGCAAACACTTGTGTGA-3'; MG2(1)R, 5'-GTGCAGTTATCCACAAGCCATATATTC-3', foram empregados em amostras de escarro de pacientes com a forma crônica. Em caso de recidiva, o teste molecular precedeu, por uma ou mais semanas, o resultado de testes clássicos e foi capaz de detectar *P. brasiliensis* em uma amostra de LCR. É necessário adquirir mais experiência para incluir testes moleculares na rotina diagnóstica. Eventuais fatores de erro com esta metodologia são a possibilidade de resultados falso-positivos, consequentes à contaminação ou ampliação não específica, e resultados falso-negativos decorrentes de questões técnicas relativas à extração do DNA ou má conservação do espécime biológico, responsável pela degradação do DNA. Nem sempre os procedimentos de observação microscópica e cultivo dos materiais biológicos podem ser realizados ou fornecem resultados positivos. A positividade das culturas pode ser prejudicada pela presença de contaminantes nos materiais semeados e, na maioria das vezes, o tempo requerido para o isolamento do fungo é longo. Por métodos moleculares pode-se realizar a identificação do fungo principalmente para os isolados atípicos. Atualmente, discute-se a possibilidade de *P. brasiliensis* não ser espécie homogênea e, portanto, espécies crípticas são aceitas. Vários iniciadores podem ser usados para a sua identificação molecular, como as sequências PbITS1s e PbITS3a, que geram um fragmento de 418 pb. Também os iniciadores

OL5 e OL3, em combinação com ITS1 e UNI\_R, respectivamente, foram capazes de discriminar *P. brasiliensis* de outros fungos patogênicos por PCR. Também se pode identificar isolados típicos e atípicos empregando sequências do gene da gp43, assim como da região ITS (*ribosomal internal transcribed spacer regions*).

### ■ Histoplasmose | Doença de Darling

A histoplasmose é uma micose primária pulmonar decorrente da inalação de esporos de *Histoplasma capsulatum*. A doença tem distribuição mundial, mas fatores climáticos, como temperatura, umidade e características do solo, parecem contribuir para sua endemicidade, em particular na América Latina e região central dos EUA. Outras regiões endêmicas incluem África, Austrália e partes da Ásia ocidental, em particular, Índia e Malásia. A histoplasmose é notável pela ocorrência de surtos em distintas regiões de países endêmicos, incluindo o Brasil, em que a doença representa uma das micoses sistêmicas mais frequentes. Inquéritos epidemiológicos comprovam a endemicidade da doença em todas as regiões, com predomínio na Região Sul do país, particularmente no Rio Grande do Sul, área considerada hiperendêmica para histoplasmose. Nos últimos anos houve aumento do número de casos em áreas não endêmicas, como os continentes europeu e asiático. A frequência, provavelmente subestimada pela existência de casos assintomáticos, ou com sintomatologia leve e inespecífica, é associada ao aumento no fluxo de turistas, empresários e imigrantes de zonas endêmicas a essas regiões, embora deva-se também à melhoria do diagnóstico da doença.

*Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico dependente da temperatura. A forma miceliana, composta de conídios e hifas, é isolada do solo, seu reservatório natural, e obtida sob condições experimentais em cultivos armazenados sob temperatura entre 25°C e 35°C. Correntes de ar atmosférico e manobras como remoção de material contaminado, para limpeza, construções ou demolições, promovem a dispersão dos conídios com alto potencial infectante e contribuem para a distribuição da doença em microfocos. *Histoplasma capsulatum* é encontrado também em animais, como morcegos, aves, roedores e marsupiais, em distintas regiões de países da América Latina. O solo, enriquecido com substâncias presentes nas fezes, promove o crescimento da fase saprofítica de *H. capsulatum* e constitui um micronicho do fungos; minas, poços, ocos de árvores, construções antigas, forros, porões e cavernas são locais propícios ao desenvolvimento do fungo e representam, assim, fontes de risco para a infecção. Nos tecidos do hospedeiro os conídios inalados transformam-se em células leveduriformes de parede espessa, que se multiplicam por gemulação única, caracterizando a forma invasiva. Em laboratório, essa forma de levedura se mantém em cultivos sob temperatura alta, entre 35°C e 37°C.

A doença é considerada uma zoonose pela Organização Mundial da Saúde. O agente da histoplasmose apresenta três variedades, a saber: (a) *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente de histoplasmose americana endêmica na América do Norte, Central e América do Sul; (b) *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana endêmica na África equatorial oriental; e (c) *H. capsulatum* var. *farciminosum*, encontrada apenas em animais. A reprodução sexual e haploide (1N) do fungo confere o nome *Ajellomyces capsulatus* ao agente da histoplasmose.

A comparação da sequência de ácidos nucleicos do rDNA e a hibridização do DNA indicam grande correlação, ainda não



totalmente desvendada, entre as três variedades de *H. capsulatum*. Quando observadas *in vivo*, as células das três variedades são semelhantes, sendo as de *H. capsulatum* var. *duboisii*, comparativamente, maiores (12 a 15  $\mu\text{m}$   $\times$  4 a 7  $\mu\text{m}$ ), com parede espessa, gemulação única e localização extracelular no tecido do hospedeiro. Essas características morfológicas teciduais podem distingui-lo da variedade *capsulatum*, pois as culturas obtidas em laboratório são, morfológicamente, idênticas.

A histoplasmose africana apresenta distribuição limitada à região intertropical da costa atlântica do continente africano. Casos esporádicos fora desse continente foram descritos na Argentina e no Japão. Os nichos ecológicos do agente etiológico ainda são pouco conhecidos, tendo sido isolado de solo contendo fezes de morcego e macacos africanos. A doença tem caráter crônico (< 80%), com lesões localizadas em tecido cutâneo (cerca de 30%), ossos (cerca de 25%); vísceras e linfonodos (cerca de 6%) ou mucosas (cerca de 5%). O polimorfismo das lesões e as formas mistas cutaneoganglionares e osteocutaneoganglionares são comuns. Formas pulmonares com infiltrado micronodular, formas hepáticas, esplênicas, digestivas e de sistema nervoso central são menos frequentes. Adenopatias podem ser múltiplas e extensas, fistulizando e evoluindo para quadro semelhante ao escrofuloderma tuberculóide. Em crianças, as formas são mais graves. A associação entre histoplasmose africana e AIDS é menos frequente do que a histoplasmose americana. A gravidade da doença depende da fase do diagnóstico e, em geral, tem evolução benigna, com taxas de letalidade baixas.

As diferenças genéticas das cepas de *H. capsulatum* talvez expliquem as manifestações clínicas distintas e justifiquem certas ocorrências, como o fato de *H. capsulatum* var. *capsulatum* estar mais associado à doença pulmonar, diferentemente de *H. capsulatum* var. *duboisii*. Se, sob ponto de vista clínico e aspectos morfológicos, as três variedades poderiam representar três espécies distintas, estudos filogenéticos sugerem a existência de, pelo menos, oito espécies, conferindo, ainda, maior complexidade ao agente da histoplasmose. Métodos de biologia molecular demonstram que *H. capsulatum* apresenta cepas distintas em relação ao grande polimorfismo de DNA. Estudos moleculares que empregam técnicas diversas, como cariotipagem, RFLP – *restriction-fragment length polymorphism*, RAPD – *random amplification of polymorphic DNA* e PCR *fingerprinting*, permitem identificar dezenas de subtipos, ou classes, dentro dessa espécie. As cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* recombina-se em culturas de laboratório e em seus nichos naturais, contribuindo para sua diversidade; há indícios de maior variabilidade molecular entre cepas da América Latina e da África se comparadas às da América do Norte. Outro fato, provavelmente relacionado com o subtipo molecular, é a maior frequência de eritema nodoso em pacientes da América Latina se comparada à de casos norte-americanos, ou mesmo, lesões cutâneas pouco comuns nos EUA, Guiana Francesa e Panamá, mas frequentes em casos da América Latina. Os achados radiográficos pulmonares na forma disseminada da doença parecem ser menos frequentes (< 50%) em casos norte-americanos do que em casos brasileiros (> 70%). Entretanto, essas diferenças podem ser atribuídas a outros fatores, como, por exemplo, demora no diagnóstico e tratamento, ou distintas respostas imunes relacionadas com a etnia ou, ainda, variados graus de virulência das cepas de acordo com a região geográfica.

A histoplasmose americana é adquirida por via pulmonar, mas são conhecidos casos raros de infecção cutânea por traumatismo cutâneo por via gastrointestinal, por ingestão de água contaminada e aquisição por transplante de órgão. Após a inalação, os conídios de *H. capsulatum* atingem o tecido alveolar e intersticial e são fagocitados por macrófagos tissulares, nos quais se reproduzem e disseminam por via linfática para linfonodos regionais ou, por via hematogênica, para o sistema reticuloendotelial, até o desenvolvimento da imunidade celular específica. A reativação de focos quiescentes foi demonstrada em casos oriundos de área endêmica da doença em que ela foi apresentada anos depois do retorno dessa região.

A forma clínica da histoplasmose americana é modulada pelo volume de inóculo inalado, assim como fatores do hospedeiro, como estado imunitário, nutricional e idade. A forma de infecção assintomática da histoplasmose é, em geral, resultado da exposição de indivíduos aparentemente hígidos a um inóculo com poucos esporos do fungo. De outra maneira, a forte exposição leva a maioria dos pacientes, sem deficiência de sistema imune, à forma pulmonar aguda, que constitui a manifestação clínica mais frequente em histoplasmose. A constatação da forma pulmonar primária assintomática é dada pela conversão da reação intradérmica de negativa para positiva. Cerca de 25% dos casos formam anticorpos que desaparecem após a cura espontânea da infecção. São raros os achados radiológicos de pneumonite ou adenomegalias hilares; a minoria forma, após meses ou anos, nódulos calcificados nos pulmões, linfonodos ou baço.

As outras duas formas da histoplasmose americana, pulmonar crônica e disseminada, ocorrem em pacientes com fatores predisponentes. As manifestações clínicas ocorrem em uma porcentagem mínima (< 10%) de indivíduos que se infectam com *H. capsulatum*. Histoplasmose pulmonar aguda benigna é a forma mais prevalente nos casos de áreas não endêmicas; doença disseminada é observada em casos com história de forte exposição a *H. capsulatum* ou, ainda, em pacientes com deficiência do sistema imune, em particular, casos de AIDS. A histoplasmose pulmonar aguda ocorre por inalação maciça de conídios de *H. capsulatum* e a gravidade da infecção pode depender do tempo de exposição. A anamnese cuidadosa sobre possível exposição a *H. capsulatum* é crucial para a hipótese diagnóstica correta; estudo de possíveis fontes de exposição, ambiental e animal, pode confirmar a origem da contaminação. Crianças expostas pela primeira vez aos esporos dos fungos representam o maior grupo nesta forma clínica. Os indivíduos sintomáticos apresentam sinais e sintomas inespecíficos, como febre, calafrios, cefaleia, mialgia, perda de apetite, tosse não produtiva e dor subesternal. As formas dermatológicas são mais frequentes em mulheres jovens, fato atribuído à maior hipersensibilidade aos antígenos de *H. capsulatum*, e o eritema nodoso é, notadamente, mais comum na América do Sul. Formas graves de histoplasmose pulmonar aguda podem suceder períodos longos de exposição, ou exposição maciça, aos conídios de *H. capsulatum*, em especial, em pacientes com deficiência de sistema imune celular. Outra forma pulmonar da histoplasmose é a chamada cavitária crônica, que tem evolução lenta e progressiva, com predileção por pacientes idosos ou de meia-idade com enfisema e doença pulmonar obstrutiva. O sintoma mais comum na histoplasmose cavitária crônica é a tosse produtiva, mas outros sintomas são febre, dor torácica, perda de peso, anorexia, astenia, suores noturnos e dor pleural.

A forma mais grave da histoplasmose é a disseminada, confirmada por isolamento ou demonstração, histológica ou citológica, de *H. capsulatum* em sítio extrapulmonar, acompanhada de evidências clínicas, radiológicas e/ou *post mortem* de envolvimento sistêmico. O desenvolvimento da histoplasmose disseminada depende, basicamente, do hospedeiro, já que



pacientes com resposta ineficaz de células T falham em reagir contra a infecção por *H. capsulatum*. Os efeitos imunossupressores de terapias atuais com inibidores do fator de necrose tumoral-alfa (*tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ ), usadas em doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, podem contribuir para o desenvolvimento de infecções granulomatosas e oportunistas, entre elas a histoplasmose. O modo de aquisição da infecção, em pacientes com diminuição do sistema imune, inclui exposição exógena e reativação de infecção latente. Numerosos estudos mostram que a histoplasmose em pacientes com deficiência do sistema imune não é tão frequente, mesmo em áreas endêmicas, o que reforça a tese de que a exposição exógena é mais plausível do que a reativação de foco infeccioso primário. Pacientes idosos, que apresentam imunidade celular parcialmente preservada, mas com atividade macrofágica ineficaz para eliminar *H. capsulatum*, podem desenvolver a forma clínica denominada histoplasmose disseminada crônica. Esta forma, que progride de maneira lenta, em meses, e tem curso fatal se não tratada, contrasta com a histoplasmose disseminada aguda fatal. Crianças, possivelmente pela imaturidade do sistema imune, podem apresentar esta forma grave e fatal da infecção. Pacientes com AIDS, pacientes transplantados, portadores de diabetes, doenças hematológicas, doença de Whipple, imunodeficiências congênitas e aqueles sob terapia com corticosteroides ou agentes quimioterápicos constituem grupo de risco para histoplasmose disseminada. Os sintomas de histoplasmose disseminada incluem febre, astenia, anorexia e perda de peso. Ao exame físico nota-se hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, petéquias em caso de pancitopenia, ulcerações de membrana mucosa e manifestações dermatológicas variadas, como úlceras, nódulos, pápulas, lesões verrucosas e pontos necróticos. As lesões de mucosa em casos de histoplasmose disseminada são mais comuns do que as relatadas em outras micoses sistêmicas, com exceção da paracoccidiodomicose. A disseminação de foco pulmonar para a cavidade bucal, sem nenhuma outra localização da doença, também pode ocorrer.

### ■ Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial de histoplasmose pulmonar aguda devem constar, ainda, paracoccidiodomicose e pneumonias comunitárias atípicas, como as causadas por *Mycoplasma*, *Legionella* e *Chlamydia*. Os casos que apresentam linfadenopatia hilar, artralgia e eritema nodoso devem ter diagnóstico diferencial de sarcoidose. Na forma cavitária pulmonar crônica a histoplasmose deve ter diagnóstico diferencial de micobacterioses, incluindo as produzidas pelo complexo *Mycobacterium avium* e *M. kansasii*, além de outras micoses endêmicas, como paracoccidiodomicose e esporotricose. Sarcoidose também deve ser considerada no diagnóstico diferencial dessa forma. A forma disseminada com lesões histiocitárias hepáticas deve ser diferenciada, principalmente, de outras infecções fúngicas e bacterianas. O diagnóstico diferencial para as lesões inflamatórias da histoplasmose gastrointestinal inclui doença intestinal inflamatória idiopática (colite ulcerativa e doença de Crohn), sarcoidose e infecções intestinais bacterianas. Lesões orais, únicas e ulceradas em pacientes que apresentem bom estado físico devem ter diagnóstico diferencial de leishmaniose cutâneo-mucosa, paracoccidiodomicose, dermatite seborreica e carcinoma escamoso.

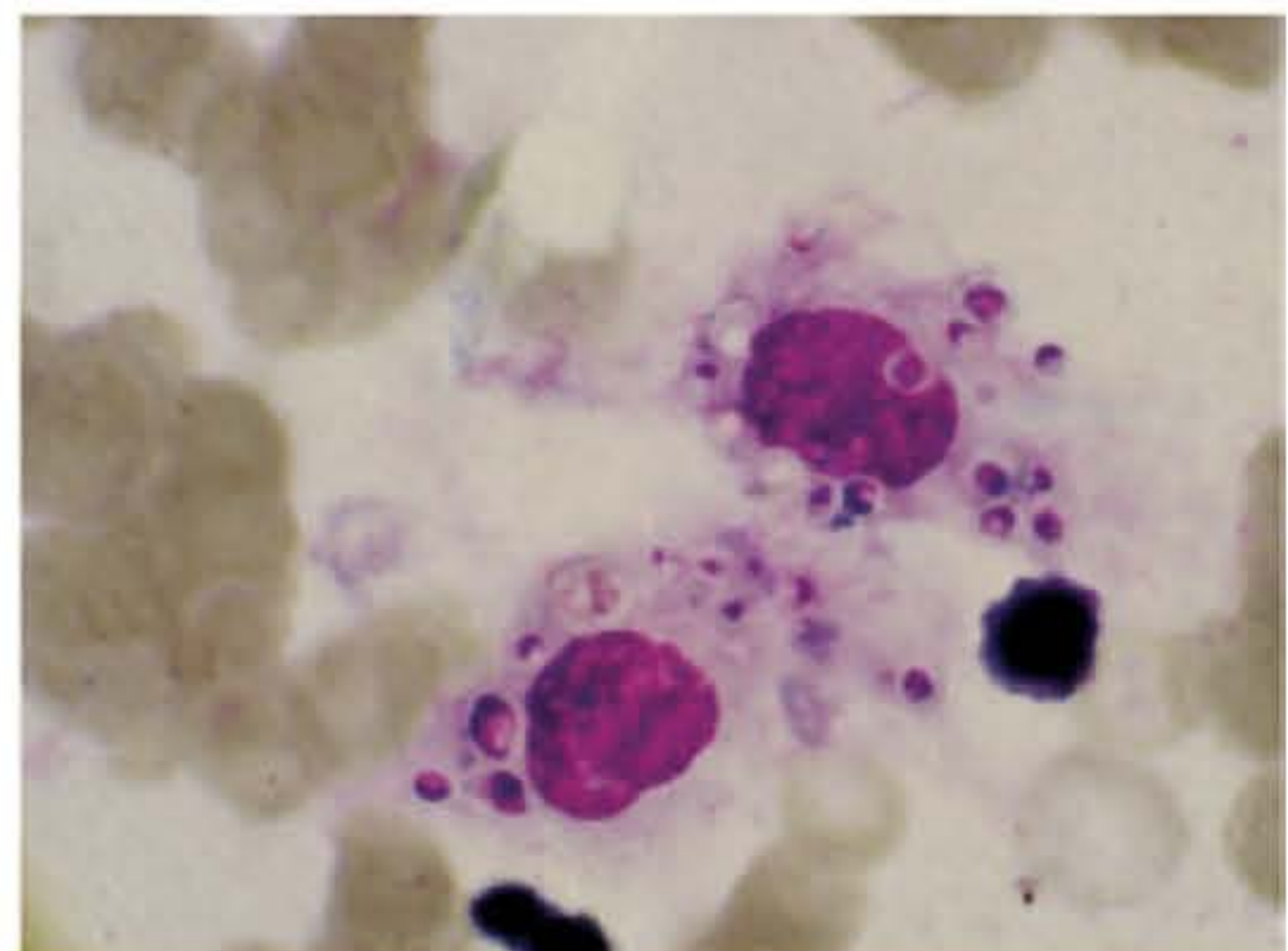
### Definição de caso de histoplasmose

O Comitê Europeu EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group) publicou a definição de caso de histoplasmose e demais micoses invasivas. A classificação leva em conta se a micose é endêmica ou não, e omite a categoria de caso *suspeito* para as micoses endêmicas. A categoria de *caso* pode ser aplicada a qualquer paciente, enquanto a de *caso provável* refere-se, apenas, a pacientes com deficiência de sistema imune. A limitação dessas definições, para a prática clínica, é que a ausência de critérios para se considerar um *caso* não descarta a possibilidade de sê-lo, mas somente indica que não existem evidências suficientes para permitir o diagnóstico de histoplasmose. Para o comitê, um *caso* de histoplasmose caracteriza-se quando há isolamento de *H. capsulatum* em cultura ou existe um resultado positivo, citológico ou histológico, para células leveduriformes intracelulares, pequenas e com gemulação única. Um *caso provável* de histoplasmose é definido na presença de, no mínimo, um fator relacionado com o hospedeiro, incluindo doença imunodepressora, tratamento com quimioterápicos, corticosteroides e outros imunossupressores de células T, além de clínica compatível e demonstração indireta do agente etiológico, como, por exemplo, resultado de antígeno positivo para *H. capsulatum*.

### Diagnóstico laboratorial

#### Exame direto da amostra

As diversas formas da histoplasmose americana produzem uma gama variada de amostras biológicas que podem ser analisadas sob exame microscópico para o diagnóstico rápido e presuntivo da doença, incluindo secreção respiratória, pus e crosta de lesões cutâneas, líquidos e tecidos diversos, aspirado de medula óssea ou ganglionar e sangue. Como o agente é, predominantemente, intracelular, colorações panóticas são mais indicadas do que o exame “a fresco” (sem coloração). Colorações segundo Leishmann, May Grünwald-Giemsa ou Wright tingem e realçam o citoplasma das pequenas células (2  $\mu$ m a 5  $\mu$ m em diâmetro) leveduriformes do fungo (Figura 32.28). Artefatos diversos e escassez do agente em determinadas amostras biológicas, como líquidos pericárdico e pleural, diminuem a especificidade e sensibilidade do exame. Amostras de medula óssea e tecido cutâneo têm



**Figura 32.28** Células leveduriformes (2  $\mu$ m a 5  $\mu$ m em diâmetro) de *Histoplasma capsulatum*, coradas com Giemsa, circundadas por halo incolor (1.000 x). (Cortesia de Fumiko Miyashita.)



maior sensibilidade, mas resultados falso-negativos podem ser vistos em até 50% dos exames de sangue. O exame citológico pode ser, portanto, pouco sensível, e um resultado negativo não deve descartar a hipótese de histoplasmose e, sempre que possível, devem ser realizadas análise histopatológica e cultura.

O diagnóstico da forma de meningite é difícil, com frequentes resultados falso-negativos, mesmo com o uso de colorações. Para alguns casos, todos os exames (citológico, histológico e cultura) são negativos e o diagnóstico presuntivo de meningite por *H. capsulatum* deve ser feito se o paciente apresentar a forma disseminada e os achados do sistema nervoso central não tiverem outra causa plausível.

### Exame histopatológico

O exame histopatológico inicial, realizado com coloração de hematoxilina-eosina, permite a observação de células leveduriformes em brotamento único, coradas em cor roxa-azulada, em regra, intracelulares, com halo incolor correspondendo à parede celular, que não é tingida pelo corante. Em geral, pela coloração de hematoxilina-eosina, as células leveduriformes de *H. capsulatum* são vistas dentro de macrófagos em infiltrado inflamatório de intensidade variada. Infiltrados insignificantes, ou mínimos, podem ser vistos em casos pediátricos e de imunocomprometidos. Em casos de infecção grave, organismos extracelulares podem, ocasionalmente, ser observados.

As lesões cutâneas polimórficas mostram grande variedade de padrões de reação tecidual:

- Macrofágico difuso
- Vasculítico com leucocitoclasia
- Escassa reação inflamatória
- Granulomatoso.

Em lesões da mucosa oral, pode-se observar reação tecidual dos tipos histiocitário difuso ou granulomatoso. Pela técnica de Gomori-Grocott, com o emprego de metenamina argêntica, as células do fungo coram-se em negro. Como complemento a este exame, pode ser realizada a reação de imuno-histoquímica, que utiliza anticorpo primário anti-*Histoplasma* com alta especificidade. Em lesões gastrintestinais, o espectro inclui infiltração linfo-histiocitária difusa, na maior parte dos casos, ulceração e nódulos linfo-histiocitários. Numerosos eosinófilos, neutrófilos e células plasmáticas, em adição a macrófagos e linfócitos, podem ser observados; células gigantes podem ser raras.

### Diferenciação de outros agentes etiológicos ao exame histológico

Embora a acurácia da identificação presuntiva por exame histológico gire em torno de 80% em relação à cultura considerada “teste-ouro” para o diagnóstico da doença, a diferenciação de outros agentes deve ser realizada. A observação de células leveduriformes intracelulares, com gemulação única e sem formação de hifas, sugere a presença de *H. capsulatum* (Figura 32.28). Apesar disso, células de *Candida glabrata* têm tamanho próximo ao de *H. capsulatum* e podem ser fagocitadas. *C. glabrata*, no entanto, é anfofílica, corando-se completamente com hematoxilina-eosina, sem a pseudocápsula. Células extracelulares de *H. capsulatum* requerem diagnóstico diferencial de *Candida* spp., que têm predomínio extracelular. *Candida* spp. induzem reação supurativa, enquanto *H. capsulatum* tende a estimular reação granulomatosa. Células de *Histoplasma*

devem ser distinguidas também de formas diminutas fagocitadas de *Cryptococcus* spp., as quais apresentam cápsulas evidenciadas pela coloração de mucicarmim Meyer. Formas diminutas de *P. brasiliensis* e formas arredondadas de *Sporothrix schenckii* também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de *H. capsulatum*. *Leishmania* spp. é o organismo mais parecido *in vivo* com *H. capsulatum*, tanto pelo tamanho e parasitismo intracelular quanto pela forma arredondada das células, em regra, dispostas em aglomerados. Porém, a ausência de gemulação, a presença de um cinetoplasto característico, além da falta de afinidade a sais de prata, com resultado negativo na coloração de Gomori e ausência de reação granulomatosa, são aspectos que ajudam na diferenciação dos agentes. *Pneumocystis carinii* também deve ser diferenciado por ausência de reprodução por gemulação, localização extracelular e por suas estruturas internas características; além disso, desencadeia reação inflamatória distinta de *H. capsulatum*.

### Cultura

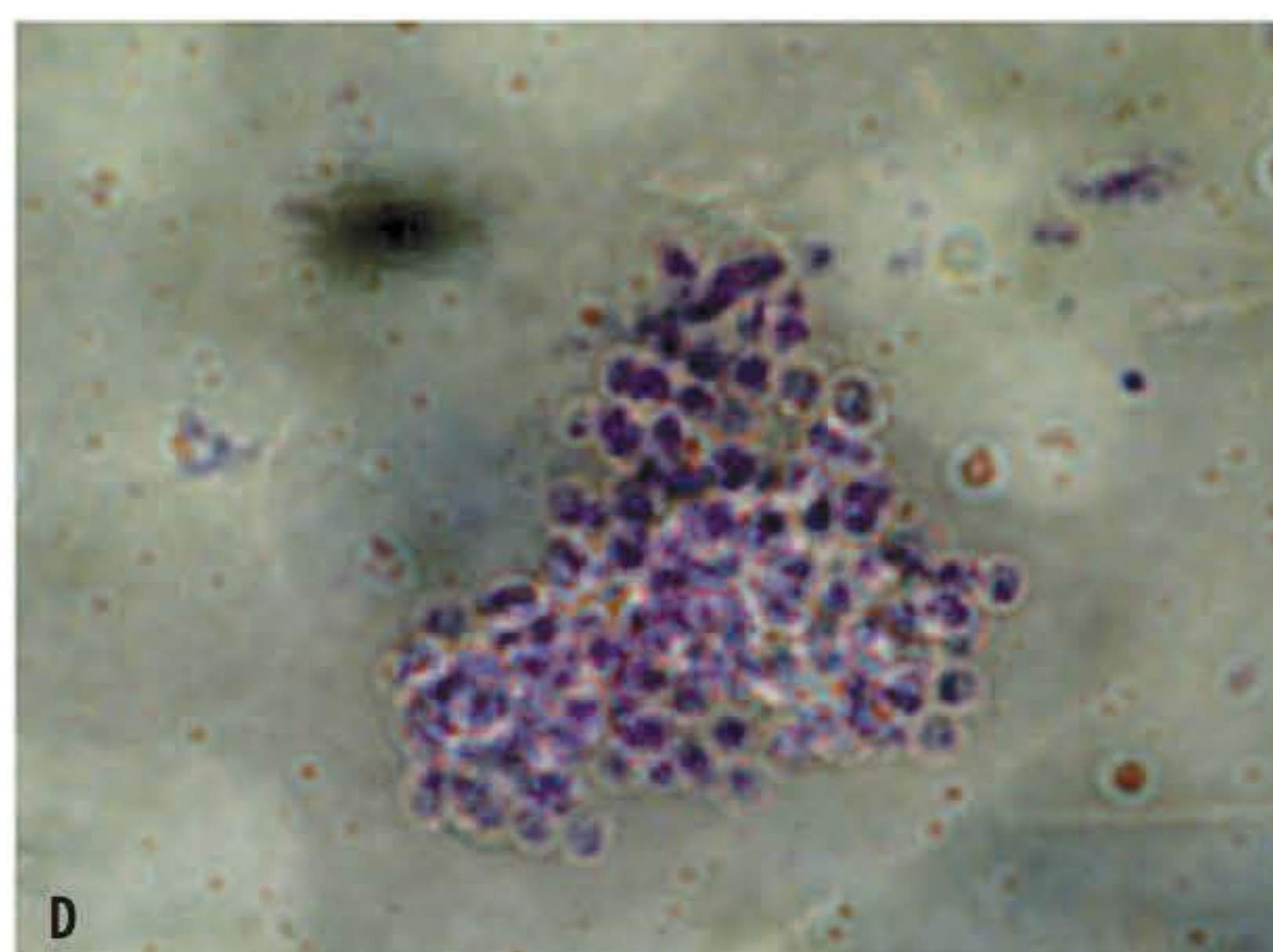
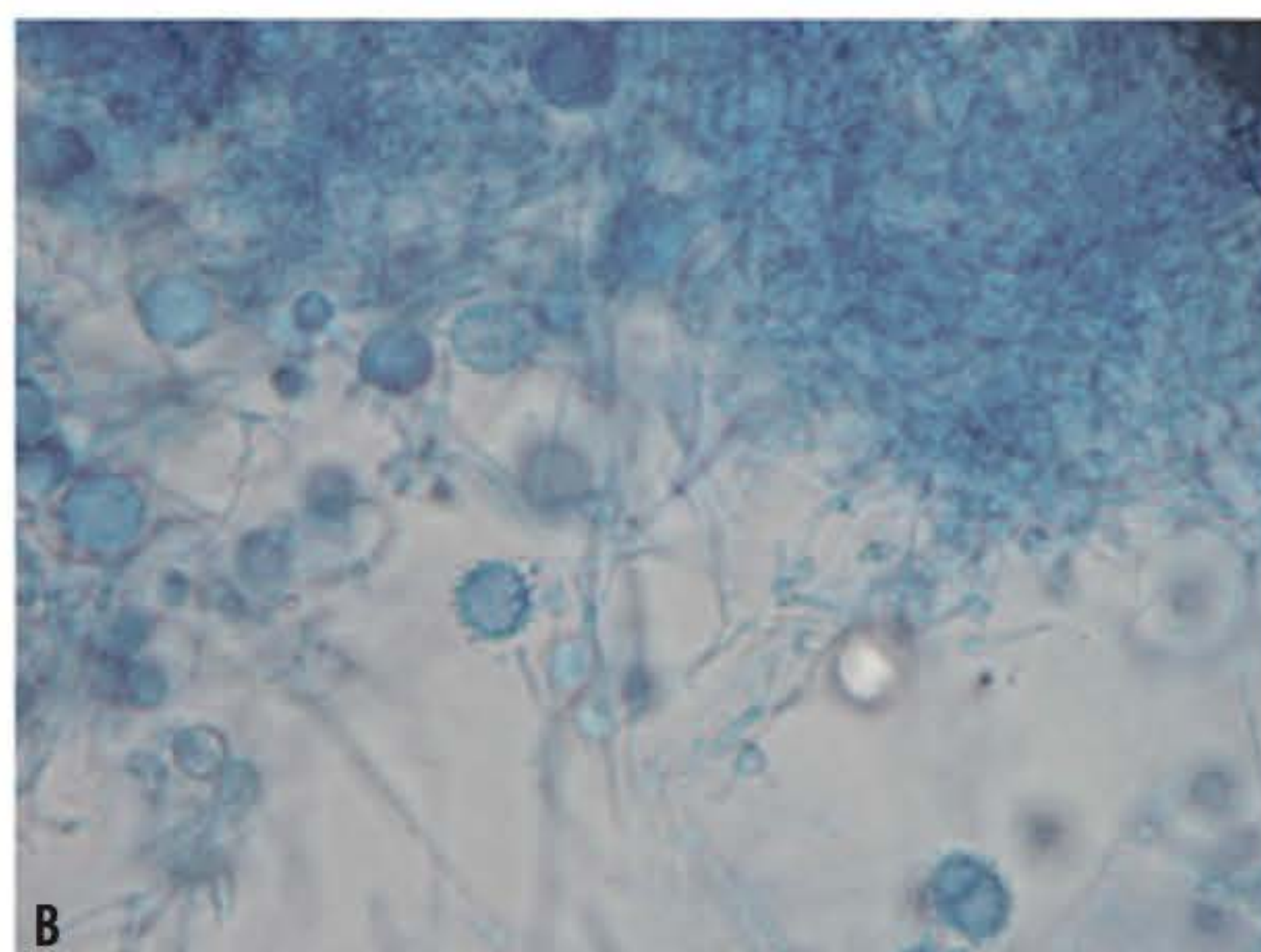
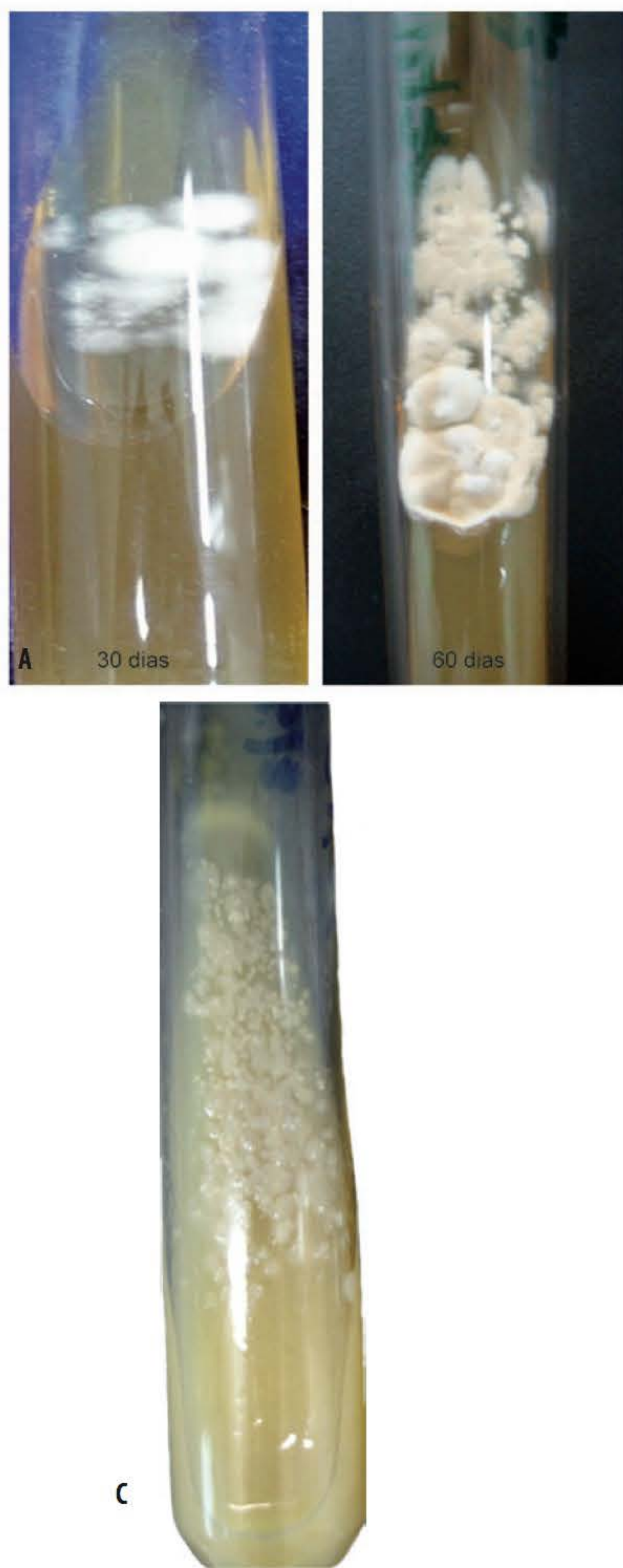
#### Fase miceliana

O cultivo de *H. capsulatum* variedade *capsularum* em laboratório é obtido tanto em meios sólidos quanto em meios líquidos de cultura. É importante ressaltar que os meios sólidos devem estar acondicionados em tubos de ensaio e nunca em placas de Petri, pois a manipulação da cultura oferece alto biorrisco ao laboratorista. O sangue e o aspirado de medula óssea devem ser inoculados diretamente em meio líquido (6 a 10%) que contenha substância anticoagulante, que não seja EDTA, um reconhecido quelante da célula fúngica. Meios comerciais para hemoculturas usados na rotina hospitalar ou frascos lacrados contendo caldo infusão cérebro-coração (BHI, *brain-heart infusion broth*), ou ainda, caldo Sabouraud, servem para o isolamento de *H. capsulatum*, desde que respeitado o prazo para crescimento do fungo. Amostras contaminadas, como secreção respiratória e urina, resultam, em regra, no isolamento de fungos contaminantes da flora oral do paciente, ou mesmo de fungos anemófilos de crescimento rápido, que impedem o desenvolvimento de *H. capsulatum* (que tem crescimento lento), fornecendo com frequência resultados falso-negativos de cultura. Todo o processamento da amostra e, obrigatoriamente, da cultura deve ser realizado em cabine classe II de segurança biológica.

Uma das características mais marcantes e que deve ser levada em conta no isolamento de *H. capsulatum* é o tempo para aparecimento das colônias em meios de cultivo. Dependendo da carga microbiana, o isolamento do fungo a partir de qualquer amostra biológica pode demorar 2 a 4 semanas. Desse modo, um resultado negativo de cultura não pode ser emitido antes de 1 mês. Apesar de definitivo, o exame de cultura não oferece diagnóstico rápido e resultado negativo de cultura não exclui a possibilidade de infecção. A cultura tem sensibilidade mais alta (85 a 95%) do que a observada ao exame citológico, o que permite diagnóstico na maior parte dos casos. Métodos comerciais que utilizam centrifugação e lise promovem a remoção de células de *H. capsulatum* de amostras de sangue, medula óssea e tecidos, podendo abreviar o tempo de isolamento de *H. capsulatum* a partir desse material. Não está provado, no entanto, que aumenta a sensibilidade do exame de cultura. Em meios tradicionais (BHI e ágar Sabouraud), as culturas de tecido e aspirado de medula óssea podem ser positivas em cerca de 70% dos casos de doença disseminada.

De acordo com a temperatura de incubação, a forma miceliana ou leveduriforme, ou, ainda, uma forma mista do fungo





**Figura 32.29** **A.** Culturas em ágar Sabouraud da fase filamentosa de *Histoplasma capsulatum* (culturas de 30 e 60 dias). **B.** Hifas e esporos característicos da fase filamentosa de *Histoplasma capsulatum* corados com lactofenol azul-algodão (400 x). **C.** Cultura em meio de infusão cérebro-coração da fase leveduriforme de *Histoplasma capsulatum*. **D.** Células leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* sob coloração de Leishmann (400 x). (Cortesia de Maria Walderez Szeszs.)

serão obtidas. O meio de cultura para isolamento do agente, em sua fase filamentosa sob 25 a 32°C, é composto por ágar Sabouraud contendo cloranfenicol para inibir crescimento bacteriano, adicionado ou não de cicloeximida, potente inibidor de fungos anemófilos. As colônias de *H. capsulatum* aparecem no meio de cultura após cerca de 2 semanas, com aspecto de penugem ou algodão de cor branca. Após 3 a 4 semanas, as colônias tornam-se duras e pregueadas e adquirem tonalidade parda ou cor de canela, com coloração acinzentada (Figura 32.29A). A microscopia revela hifas finas (2 a 4 µm),

septadas, hialinas, com esporos pequenos (2 µm a 5 µm) e piriformes, além de esporos grandes característicos (10 µm a 15 µm em diâmetro) de forma esférica com parede espessa e irregular com expansões digitiformes, que lembram a forma de um “girassol” (Figura 32.29B).

#### *Diferenciação de outros agentes etiológicos na fase miceliana*

As características morfológicas de *H. capsulatum* na fase miceliana são semelhantes às de alguns fungos contaminan-



tes de meio ambiente, como *Sepedonium* spp., *Chrysosporium* spp. e *Renispora* spp. e, portanto, a identificação de *H. capsulatum* requer a obtenção da fase leveduriforme deste agente, ainda que os anemófilos tenham crescimento mais rápido. A cultura miceliana deve ser submetida a essa transformação, ou pareada, com outra cultura de amostra biológica processada à temperatura de 35 a 37°C.

#### Fase leveduriforme

A fase leveduriforme de *H. capsulatum* é mais difícil de ser obtida do que a miceliana, e formas mistas das duas fases são comuns quando a cultura do fungo é mantida em temperatura alta (acima de 33°C). Meios de cultura mais ricos, adicionados de cisteína, sangue ou gema de ovo, com pH 6,5 são indicados para a reversão do fungo à fase leveduriforme, entre 35 e 37°C. A partir do décimo dia inicia-se o desenvolvimento de colônias de aspecto pastoso, pregueado e cor creme (Figura 32.29C). O exame microscópico (400 ×) mostra blastoconídios pequenos (3 a 5 µm) em gemulação única (Figura 32.29D).

#### Diferenciação de outros agentes etiológicos na fase leveduriforme

As células em brotamento único diferem do gênero *Candida*, que apresenta multibrotamento. Além desse aspecto, o tempo para início de crescimento de isolados de *Candida* gira em torno de 24 e 72 h, muito menor do que o necessário para a fase leveduriforme de *H. capsulatum* (acima de 10 dias).

#### Provas imunológicas

Em casos de resultado negativo ao exame direto da amostra e para confirmação rápida do exame, existem provas imunológicas que são ferramentas muito úteis. Testes sorológicos são positivos em, aproximadamente, dois terços dos casos de histoplasmose. Muitas vezes são necessárias amostras de soro da fase aguda e convalescência para a correta interpretação do resultado. Podem ser empregados para casos disseminados e crônicos, sendo menos sensíveis para casos da forma pulmonar localizada e no diagnóstico da forma aguda da doença. A maior dificuldade no emprego de métodos imunológicos no Brasil é a necessidade, ainda, de importação dos reagentes necessários aos testes, pois ainda não existe produção industrial desses produtos. Alguns laboratórios de referência, em universidades e institutos de pesquisa, produzem esses materiais e podem dar apoio ao diagnóstico imunológico da histoplasmose.

A especificidade e sensibilidade das provas sorológicas dependem da técnica usada, mas principalmente da qualidade do reagente usado, isto é, do preparado antigênico utilizado para a reação sorológica e, a cada dia, se desenvolvem novos preparados antigênicos para essa finalidade. Extratos antigênicos não purificados dão resultados duvidosos e, atualmente, moléculas quimicamente definidas, em sua forma primitiva ou recombinada, são as mais indicadas para uso em provas imunológicas. Moléculas caracterizadas pelo peso molecular, como 120 kDa e 140 kDa, são alternativas adequadas para a pesquisa de anticorpos contra *H. capsulatum* no diagnóstico da doença. Atualmente, provas enzimáticas (*enzyme immune assay*, ELISA) e de imunoprecipitação podem ser realizadas com antígenos específicos purificados. A técnica de *Western blot* tem alta especificidade e sensibilidade para a detecção dos antígenos M e H na fase inicial da forma pulmonar aguda da histoplasmose.

#### Pesquisa de anticorpos

Os anticorpos formados contra antígenos de parede celular, em geral, não são específicos e reações cruzadas ocorrem em testes com soro de pacientes de áreas endêmicas para paracoccidiodomicose, doença de Jorge Lobo, esporotricose e outras. Dessa maneira, as provas de radioimunoensaio e fixação de complemento têm baixa especificidade. A prova de imunodifusão permite a observação de duas bandas precipitantes relacionadas a antígenos do fungo: M e H. O antígeno M é uma glicoproteína que constitui o antígeno imunodominante de *H. capsulatum*; é específico da espécie, tem atividade de catalase e peso molecular de 94 kDa. A importância de demonstrar anticorpos contra essa fração baseia-se no fato de que as precipitinas aumentam na fase aguda da doença. A prova de imunodifusão é bastante específica, mas pode demorar até 4 semanas, após o início dos sintomas, para prover resultados positivos. Esta prova pode, ainda, dar resultados falso-negativos, em taxas significativas (40 a 80%), particularmente em portadores de deficiências imunológicas.

#### Pesquisa de antígenos

Dadas as dificuldades das provas para demonstração de anticorpos contra *H. capsulatum*, existe grande interesse para ensaios dirigidos à detecção de antígenos e outras moléculas. A pesquisa de antígenos circulantes de *H. capsulatum* é indicada para soro e urina. Polissacarídios termoestáveis podem ser detectados por técnica de radioimunoensaio no diagnóstico de doença disseminada. Antigenemia é detectada em 85% e antigenúria, em 92 a 95% dos casos com doença disseminada, e pode ser observada em infecção primária após forte exposição aos conídios do fungo. A antigenúria por *H. capsulatum*, em casos de áreas endêmicas, permite o diagnóstico de *infecção provável*, considerando-se critérios clínicos e fatores do hospedeiro, mas não pode ser considerada evidência de caso de histoplasmose porque o antígeno de *H. capsulatum* pode ser encontrado em urina e soro de pacientes com coccidiodomicose, doença que já foi comprovada em casos autóctones no Brasil. A detecção de antigenúria é, particularmente, útil nos casos tratados para monitoramento de recorrência em pacientes com AIDS; a prova deve ser realizada a intervalos de 3 meses. Se, por um lado, a detecção de antígeno em soro e urina é sensível para diagnosticar histoplasmose disseminada, a prova tem baixo desempenho para identificar casos de histoplasmose pulmonar. A pesquisa de antígeno em líquido cefalorraquidiano pode ser útil em até 70% dos pacientes com meningite por *H. capsulatum*, nos quais os exames micológicos dão, em geral, resultados falso-negativos.

#### Intradermorreação com histoplasmina

A histoplasmina é uma composição de antígenos do fungo que pode ser usada para realizar testes imunológicos. Se, por um lado, o teste não é indicado para o diagnóstico da doença em áreas endêmicas, tem grande valor para a realização de inquéritos epidemiológicos de prevalência da infecção e, deste modo, estimativa da doença. A interpretação de resultados positivos para testes intradérmicos com histoplasmina deve ser cautelosa, pois a reatividade intradérmica pode persistir mesmo após a remissão da doença, ou seja, a prova não permite a diferenciação entre doença ativa e infecção pregressa. Em regiões endêmicas, a intradermorreação é positiva em cerca de 50 a 80% da população assintomática. A prova é muito importante para indivíduos sintomáticos, moradores de áreas não endêmicas. A aplicação da histoplasmina induz a formação de anticorpos específicos que poderão ser detectados em provas



sorológicas subsequentes, gerando resultados falso-positivos. O valor preditivo da prova, em casos com doença pulmonar crônica, é menor, pois resultados falso-negativos são relatados em taxas acima de 20%. Em pacientes com deficiência de sistema imune e formas graves da doença, a reação intradérmica pode ser negativa em 25 a 50%.

### ▪ Coccidioidomicose

A coccidioidomicose, também conhecida como doença de Posadas-Wernicke, reumatismo do deserto, é uma micose sistêmica causada por *Coccidioides immitis*, um fungo que é endêmico em regiões áridas e semiáridas do continente americano; o sudoeste dos EUA e norte do México constituem a maior área na qual o fungo é conhecido por ser endêmico. É encontrado também em áreas endêmicas das Américas Central e do Sul. A região semiárida do Nordeste do Brasil só recentemente foi identificada como área endêmica de coccidioidomicose. Como pouco se sabe sobre a coccidioidomicose no Brasil, é provável que muitos casos desta micose sejam incorretamente diagnosticados como pneumonia inespecífica, tuberculose ou mesmo pneumoconiose e silicose. Com base em estudos de filogenia molecular, a existência de outra espécie foi descrita e designada como *Coccidioides posadasii*. Portanto, *C. immitis* corresponde aos isolados na Califórnia, especialmente no Vale de São Joaquim, e *C. posadasii* é predominante em todas as demais áreas endêmicas do continente americano, desde o sul dos EUA até a Argentina. Por conseguinte, o agente etiológico da micose no Brasil é denominado *C. posadasii*. O fungo é confinado a regiões com verões quentes e áridos. Em certas áreas dos EUA, estima-se que 50.000 a 100.000 pessoas infectem-se por ano. Em certas áreas endêmicas, 90% da população têm teste cutâneo positivo a esferulina. No Nordeste do Brasil, os testes cutâneos realizados com coccidioidina no interior do Ceará e Piauí foram positivos em 26,4% e 10,0% dos casos, respectivamente. Os estados nordestinos do Piauí, Ceará, Maranhão e Bahia constituem a mais recente área endêmica de coccidioidomicose definida nas Américas. É esperado o diagnóstico de novos casos nos demais estados do Nordeste, que são semelhantes em termos de clima e vegetação.

Após a inalação dos artroconídios, os organismos podem causar infecção pulmonar leve e transitória em indivíduos normais, mas podem também causar instituir doença progressiva nos pulmões ou mais generalizada. As manifestações clínicas podem ser variáveis, desde uma infecção pulmonar primária (60%) à infecção pulmonar crônica (5%) e à forma disseminada (1%), que tendem a ocorrer em indivíduos debilitados ou imunodeprimidos. Esta doença é também frequente entre os aidéticos.

Os fungos dimórficos *C. immitis* e *C. posadasii* crescem como sapróbios, formando micélios hialinos, com colônias esbranquiçadas, cotonosas. A partir do 5º dia de cultura, uma grande quantidade de artroconídios se desprende das hifas; eles apresentam paredes espessas e têm forma de barril, sendo geralmente multinucleados. Nos tecidos e em condições especiais de crescimento *in vitro*, apresentam-se como esférulas com endósporos. A forma característica parasitária é a esférula de paredes grossas, contendo inúmeros endósporos pequenos, globulares, que é observada em preparações com hidróxido de potássio ou em cortes histológicos corados com HE, periódico ácido de Schiff ou coloração de Grocott-Gomori.

As preparações a fresco são observadas de escarro, pus ou sedimento de LCR, em que esférulas com endósporos permi-

tem o diagnóstico. Esférulas imaturas podem ser confundidas com outros patógenos.

Culturas devem ser feitas em meios de ágar Sabouraud-cloranfenicol, ágar sangue com ou sem cloranfenicol e cicloeximida. Para o fungo esporular, meios de ágar fubá, ágar extrato de levedura-glicose ou ágar fosfato extrato de levedura são indicados.

Colônias desenvolvem-se após 3 a 5 dias de coloração acinzentada, membranosa no início e depois com abundante micélio aéreo de cor branca. Artroconídios desenvolvem-se após 10 a 14 dias. O manuseio desse fungo deve ser feito com muito cuidado, pois os artroconídios são altamente infectantes.

As três principais reações para detecção de anticorpos são: precipitação em tubo, fixação de complemento e imunodifusão em gel de ágar (IDGA). O primeiro detecta anticorpos IgM e aparecem no início das formas primárias, das quais 75% reagem positivamente. O teste de IDGA é o mais utilizado. Na rotina, um kit disponível comercialmente para a reação de IDGA para *C. immitis* é geralmente utilizado, a sensibilidade varia de 70 a 90%, de acordo com o perfil dos pacientes, e a especificidade é alta. Os iniciadores Cocci I (5'-GTA CTA TTA GGG AGG ATA ATC GTT-3') e Cocci II (5'-GGT GTC AAC TGG TGG GAT GTC AAT-3'), relacionados com a proteína da parede celular e responsável por amplicom de 526 pb, são usados na identificação de *C. posadasii*.

### ▪ Hialo-hifomicose

Hialo-hifomicose é um grupo de infecções fúngicas causadas por fungos caracterizados por formar hifas septadas hialinas e que podem afetar tanto pacientes imunocompetentes como imunocomprometidos. Fungos com hifas hialinas – hialo-hifomicetos – dispersos na natureza, de caráter oportunista, são capazes de produzir manifestações clínicas diversas denominadas hialo-hifomicoses. As formas podem ser: pneumonia, endoftalmite, meningite, endocardite ou disseminada. As condições predisponentes mais frequentes são: doença neoplásica ou cronicodegenerativa, quimioterapia, radioterapia, granulocitopenia, uso abusivo de drogas e AIDS.

Os hialo-hifomicetos podem causar, em indivíduos aparentemente saudáveis, oncomomicose e otomicose. A relação agente-doença, nesses casos, deve ser avaliada com critério, levando-se em conta:

- Resultado positivo ao exame direto
- Isolamento do fungo a partir de amostras biológicas seriadas
- Diagnóstico diferencial de outras infecções
- Comprovação da invasão do fungo no tecido do hospedeiro.

Muitas vezes é difícil distinguir fungos patogênicos de saprofitas, pois muitos desses agentes podem assumir significado clínico, dependendo das situações. Vários agentes etiológicos estão incluídos nesta definição, como *Aspergillus*, *Fusarium solanii*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Pseudallescheria boydii*, *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*, *Acremonium* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* sp., *Scopulariopsis* sp., *Scytalidium hialinum*, *Phialemonium* sp., *Emericella* sp., *Aphanoascus*, *Beauveria* sp., *Coprinus* sp. e *Cylindrocarpon* sp. A identificação de gênero baseia-se, primariamente, na análise morfológica do fungo. Alguns desses fungos apresentam pigmentação marrom-escura em meio de cultura, mas, no tecido hospedeiro, apresentam hifas hialinas e, por isso, são considerados agentes de hialo-hifomicose.



## Aspergilose

A aspergilose, doença causada por membros do gênero *Aspergillus*, pode se apresentar sob diversas formas clínicas. As três principais são: resposta alérgica aos esporos inalados (aspergilose broncopulmonar alérgica), colonização de espaços pré-formados (aspergiloma) e invasão de tecidos (aspergilose invasiva). Esta forma tem emergido como causa de infecção grave e com risco à vida em pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com infecção avançada pelo HIV, neutropenia prolongada e imunodeficiência primária, bem como transplantados de pulmão e de medula óssea. A aspergilose pulmonar invasiva tem emergido como uma doença infecciosa de alta morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Há também evidências do envolvimento de *Aspergillus* spp. em processos de asma.

A gravidade da doença varia de acordo com a extensão das lesões, o tempo de evolução clínica, o tipo de órgão afetado e grau de resistência orgânica do hospedeiro. O espectro da doença inclui também otomicose, queratite micótica e formas raras de micetoma.

A aspergilose também tem importância em medicina veterinária, causando aborto em ovelhas e vacas e infecções pulmonares em aves. Intoxicação ou toxicose em animais, devido à ingestão de grãos que contenham micotoxinas, não é rara.

Os agentes são fungos filamentosos ubiquitários e anemófilos. Diferentes espécies de *Aspergillus* estão relacionadas com doença humana. *A. fumigatus* é o agente mais comum, tanto de formas invasivas como de não invasivas, seguido de *A. flavus*, isolado de aspergilose invasiva em pacientes imunocomprometidos e de lesões originadas nos seios nasais; *A. niger* é o terceiro agente mais comum de aspergilose pulmonar invasiva. *A. niger* e *A. fumigatus* são também os mais comuns agentes de aspergiloma. Outras espécies podem estar envolvidas em casos de aspergilose humana ou animal, como *A. terreus*, que é resistente à anfotericina.

A aspergilose tem ocorrência mundial, sem predominância de idade, sexo ou raça. *A. fumigatus* é encontrado no solo, ar atmosférico e também frequentemente associado a matérias orgânicas em decomposição. Cresce bem à temperatura de 55°C. O gênero *Aspergillus* é provavelmente o grupo de fungos mais comum no meio ambiente. A maioria das espécies é encontrada no solo, vegetais, ar atmosférico, alimentos etc.

O habitat de *Aspergillus* permite a contaminação intensa de todos os ambientes, incluindo hospitais, e isso pode justificar o aumento significativo registrado nas últimas décadas de casos de infecção nosocomial por esse gênero, em pacientes suscetíveis. Espécies de *Aspergillus* produzem conídios com 2 a 5 µm de diâmetro, em cadeias que facilmente se rompem e ficam em suspensão no ar atmosférico.

As prováveis fontes do fungo são relacionadas com contaminação ambiental, principalmente nos sistemas de ventilação. A presença de vasos com flores em hospitais e o problema de poeiras em suspensão devido às reformas hospitalares resultam em aumento da concentração de conídios. Na época do inverno, o número de conídios parece ser maior do que em outras estações e estaria associado à queda das folhas. Medidas de proteção devem ser realizadas nas unidades com pacientes imunocomprometidos, incluindo a instalação de filtros do tipo HEPA, especialmente em unidades de transplante de medula óssea.

Fazendeiros e jardineiros podem inalar milhões de esporos e, se forem hipersensíveis, podem ser acometidos de grave resposta alérgica. Os esporos inalados podem germinar e os

fungos podem invadir os tecidos pulmonares se os indivíduos estiverem imunodeprimidos.

Embora a aspergilose geralmente seja adquirida por inalação dos conídios, em algumas ocasiões, estes podem ter acesso direto aos tecidos expostos durante o ato cirúrgico, contaminar esparadrapos ou adesivos cirúrgicos, soluções parenterais, medicamentos etc.

## Diagnóstico laboratorial

Espécimes clínicos como secreções de trato respiratório, fluxo nasal, escamas subungueais, pus e tecidos biopsiados podem ser utilizados para exame microscópico direto e cultura. Secreções espessas, purulentas ou sanguinolentas devem ser previamente digeridas antes do exame direto e cultura. O uso do lavado broncoalveolar, amostra de biopsia percutânea transtorácica e biopsia toracoscópica videoassistida é um procedimento padrão para diagnosticar aspergilose pulmonar invasiva. Os resultados falso-negativos podem ocorrer em situações de uso prévio de antifúngicos ou quando a coleta não puder atingir a área afetada.

Em casos de aspergilose cavitária, numerosas hifas entrelaçadas podem estar presentes no material biológico se a cavidade estiver conectada ao bronquíolo. Estruturas de reprodução do fungo, tais como conidióforos, vesículas e esterigmas, são, ocasionalmente, observadas, o que significa que o fungo está colonizando áreas em contato com o ar.

Em casos de aspergilose invasiva, hifas são raramente vistas em secreção respiratória. Material obtido por biopsia e previamente macerado permite a observação de hifas. As hifas podem ser vistas em colorações como HE, no entanto, o fungo é mais bem visualizado em colorações de Gomori, PAS ou de Gridley. A morfologia típica no caso de aspergilose é a presença de hifas septadas, hialinas, com ramificação dicotômica (Figura 32.30).

O achado histológico de hifas hialinas septadas com ramificações não é específico de *Aspergillus* spp. Outros métodos, como a PCR, podem ser necessários para identificar o fungo.

A identificação do sinal do halo e do sinal do crescente aéreo em uma tomografia computadorizada do tórax pode facilitar o diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva em pacientes neutropênicos com doenças hematológicas. Outros agentes infecciosos apresentam esses sinais e devem ser incluídos no diagnóstico diferencial (zigomicetos, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Nocardia* spp.).

Resultado do exame direto positivo: presença de hifas septadas hialinas, com ramificações dicotômicas em ângulo de 45°, compatíveis com *Aspergillus* sp.

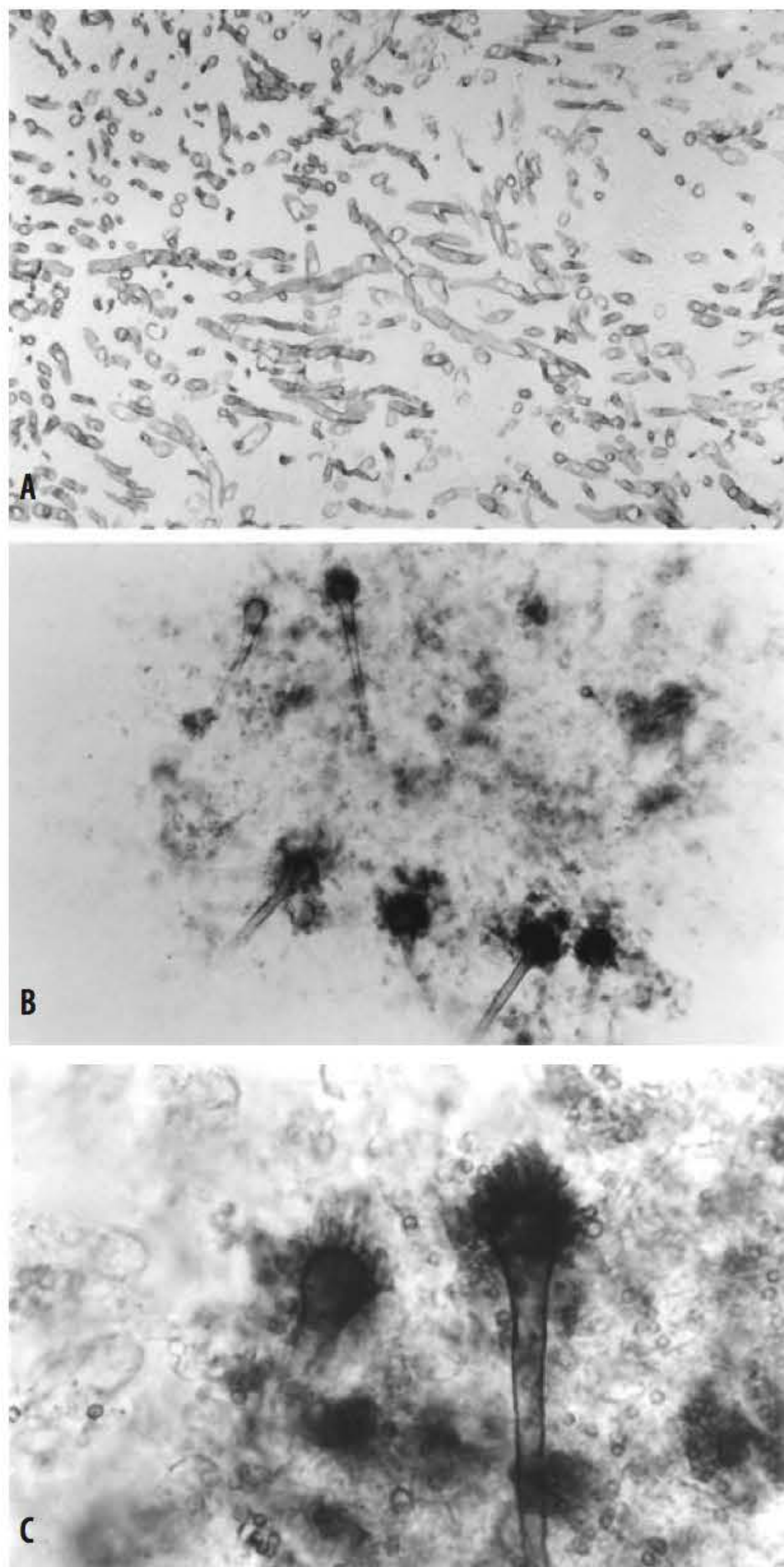
## Cultura

As espécies de *Aspergillus* crescem com facilidade e rapidez nos meios convencionais; os mais usados são ágar Sabouraud e ágar extrato de malte com antibióticos. Algumas espécies são sensíveis à cicloeximida e, portanto, meios com este composto não devem ser usados.

O gênero *Aspergillus* é complexo, e a forma perfeita está distribuída em 10 gêneros que formam ascósporos: *Chaetosartorya*, *Dichlaena*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Hemicarpenteles*, *Neopetromyces*, *Neosartorya*, *Petromyces* e *Warcupiella* sp.

A maioria das espécies patogênicas tem temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37°C, embora a esporulação seja mais abundante a 30°C. A macromorfologia da cultura, em geral, apresenta tonalidade forte e variada. As estruturas de reprodução caracterizam a espécie e são produzidas dentro de





**Figura 32.30** Aspergilose. Hifas septadas dicotômicas em ângulo agudo: **A.** Coloração de Gomori (1.000 x). **B.** Cabeça aspergilar com fiálides e conídios de *Aspergillus* sp. (escarro) "a fresco" (400 x). **C.** "A fresco" (1.000 x).

48 a 72 h. Algumas cepas oriundas de secreção respiratória de pacientes com aspergiloma têm crescimento lento, colônias sem pigmentação e esporulação atípicas, o que torna difícil sua identificação.

Devido ao caráter ubiquitário de *Aspergillus*, cuidados redobrados são necessários quando se realizam as culturas. A interpretação de resultado positivo para a cultura deste gênero não indica, necessariamente, diagnóstico de aspergilose, já que pode ter ocorrido contaminação ambiental ou mesmo da flora do paciente com espécies saprófitas. A confirmação de um achado requer o isolamento seriado de uma única espécie a partir de diferentes espécimes clínicos. Além disso, a cultura precisa ser pura no primeiro isolamento. O diagnóstico de aspergilose é confirmado se houver resultado positivo em exame direto associado ao isolamento do fungo. O isolamento de *Aspergillus* em hemoculturas de casos de aspergilose invasiva disseminada é muito raro.

A confirmação por meio da cultura é importante para distinguir a aspergilose pulmonar invasiva de infecções causadas por outros fungos filamentosos, como *Scedosporium* spp. e *Fusarium* spp. O valor preditivo positivo da cultura de uma amostra respiratória coletada esterilmente aumenta com o quadro de imunossupressão.

A maioria das espécies reproduz-se assexuadamente, mas algumas o fazem pela via sexuada, formando ascósporos. O gênero *Aspergillus* é classificado na família Moniliaceae na classe dos Hyphomycetes da divisão Deuteromycota. As espécies teleomorfas são classificadas em diferentes gêneros da divisão Ascomycota.

A diferenciação das espécies é fundamentada em diferenças nas suas características culturais e morfológicas. As espécies de *Aspergillus* são classificadas em grupos de acordo com as seguintes características: cor e forma da cabeça conidial, número de fiálides, forma da vesícula, cor dos conídios e conidióforos.

As espécies do gênero *Aspergillus* apresentam conidióforos simples, hialinos ou pigmentados que se originam da célula-pé. O conidióforo em seu ápice dilata-se em uma vesícula de forma variada (globosa, subglobosa e clavada), hialina ou pigmentada, da qual surgem as fiálides, que podem ser uni ou bisseriadas. Além dessas características, a cor e a forma das cabeças conidiais constituem elementos importantes na separação dos diferentes grupos.

Vários estudos fenotípicos e genotípicos têm sido utilizados para distinguir entre isolados de *Aspergillus* de fontes humanas. Metodologias como RFLP foram usadas, e as enzimas XhoI e SalI parecem resultar em maior poder discriminatório com esta abordagem. Adicionalmente, esta metodologia foi usada com a sonda associada em metodologia de hibridização com o probe Afut1.

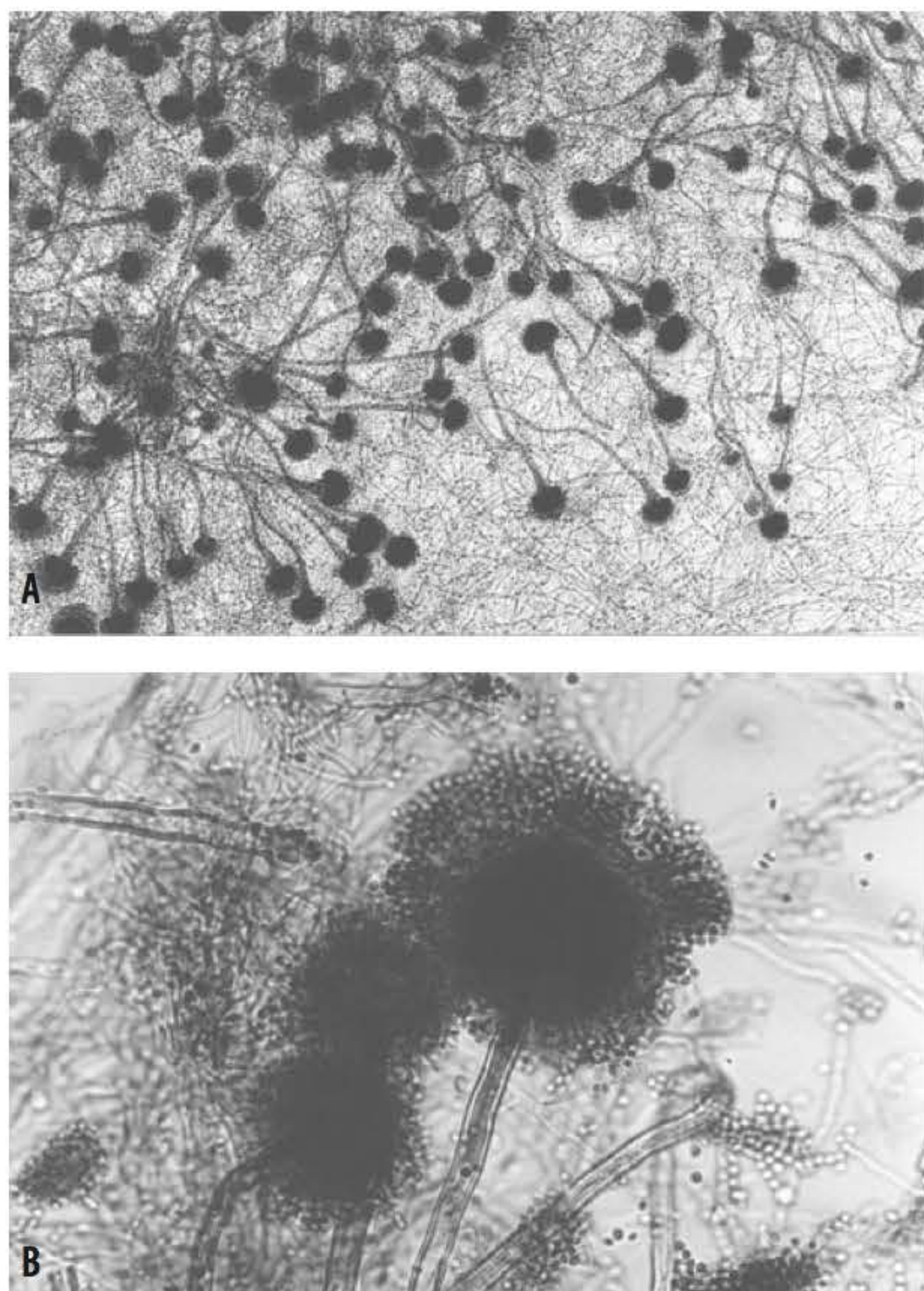
Na Figura 32.31 estão representados os aspectos microscópicos de agentes de aspergilose.

#### Imunodiagnóstico

Os testes sorológicos são usados para auxiliar no diagnóstico das várias formas clínicas da aspergilose. A detecção de anticorpos no soro ou em outros líquidos biológicos e a reatividade de testes cutâneos dependem em grande parte da preparação antigênica, de sua pureza e natureza química. Nos diferentes ensaios são usados extratos brutos derivados do micélio, exoantígeno e, mais recentemente, antígenos purificados e recombinantes. Algumas preparações antigênicas estão disponíveis comercialmente, no entanto, antígenos padronizados ainda não têm ampla disponibilidade. As preparações antigênicas são variáveis de lote para lote e há também o problema da reatividade cruzada. A detecção de anticorpos tem maior valor nos casos de aspergilose broncopulmonar alérgica e no aspergiloma, no entanto, nos casos de aspergilose invasiva eles são pouco úteis, pois os pacientes apresentam baixa ou nenhuma resposta humoral.

Em pacientes com aspergilose invasiva, a detecção de antígeno é preferível para um diagnóstico mais precoce, bem como no acompanhamento da terapêutica. A detecção de galactomanana, um polissacarídeo de parede celular de *Aspergillus* spp., é empregada como marcador no diagnóstico de aspergilose invasiva na ausência de cultura. No soro, urina e outros líquidos biológicos desses indivíduos, uma galactomanana, polissacarídeo presente na parede celular de *Aspergillus*, pode ser detectada. Vários tipos de testes são usados, como a aglutinação com partículas de látex e o teste imunoenzimático. Estes estão disponíveis comercialmente, no entanto, como a





**Figura 32.31** Aspectos microscópicos de agentes de aspergilose. **A.** *Aspergillus fumigatus* (10 ×). **B.** *A. flavus* (400 ×).

galactomanana está presente em pequenas quantidades e é rapidamente eliminada, há necessidade de testes com alta sensibilidade e análise de amostras seriadas. O teste imunoenzimático sanduíche, empregando anticorpo monoclonal (MAb), EB-A2, que liga a tetra (1→5)-beta-d-galactofuranana, o epítopo imunodominante da galactomanana, apresentou níveis elevados de sensibilidade e especificidade e bom valor preditivo. O teste detecta antígeno no soro em concentração de até 1 ng/mL. A sensibilidade varia de 67 a 100%, com especificidade de 81 a 99% em pacientes neutropênicos e receptores de transplante alogênico.

Embora tenha sido amplamente utilizada como critério de diagnóstico para aspergilose invasiva, uma das principais limitações do ensaio são as falsas reações, especialmente em pacientes pediátricos, com rejeição ao enxerto, e naqueles que estejam usando antibióticos derivados de fungo, como piperacilina tazobactam. O MAb EB-A2 reage cruzadamente com fungos não *Aspergillus*, com galactomanana contaminante em antibióticos betalactâmicos e em gêneros alimentícios, e com ácidos bacterianos lipoteicoicos. Mesmo assim, o seu uso pode facilitar o diagnóstico precoce e a determinação de antigenemia seriada pode auxiliar na avaliação da resposta terapêutica. Em pacientes de alto risco, o teste deve ser realizado 2 vezes/semana. Portanto, a duração do tratamento pode ser determinada pela normalização da antigenemia, bem como pela resolução dos sintomas clínicos e radiológicos.

A combinação entre antigenemia e tomografia computadorizada do tórax deve permitir o diagnóstico precoce e tratamento. A presença de anticorpos anti-*Aspergillus*-IgG (teste de

formato EIA) é usada como teste confirmatório após a recuperação da função de leucócitos durante a terapia.

Outro potencial marcador é (1→3)-β-d-glucana. A presença de β-d-glucana corresponde à infecção invasiva por fungos, no entanto, o teste não é específico.

A utilização da PCR é promissora, porém ainda não foi normalizada.

Pacientes com aspergilose broncopulmonar alérgica apresentam níveis elevados de IgE, IgE específica e IgG<sub>4</sub>. No caso de aspergiloma, verifica-se resposta humoral contra diferentes antígenos, podendo-se detectá-la por reações de precipitação em gel de ágar, como imunodifusão e contraímunoeletroforese. Por *immunoblot* pode-se verificar a presença de um antígeno de valor diagnóstico ao redor de 90 kDa.

Testes cutâneos são empregados em casos suspeitos de aspergilose broncopulmonar alérgica, dermatite atópica ou asma aspergilar. Alergênicos recombinantes são usados tanto no teste cutâneo como também em um imunoensaio de fase sólida comercial.

### Métodos moleculares

A aspergilose invasiva é doença com alta taxa de mortalidade, e o diagnóstico rápido é necessário para melhorar o prognóstico desses pacientes. A sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares tornam-nos alternativas promissoras, que podem levar a um diagnóstico mais precoce. A técnica de PCR foi usada por vários autores e parece ser metodologia de grande utilidade no diagnóstico de aspergilose invasiva. Algumas sondas desenvolvidas são altamente sensíveis e específicas, detectando 1 pg de DNA genômico. As sondas derivadas das sequências 28S e 18S de rRNA foram, até agora, as mais usadas no PCR para *Aspergillus*. Outro aspecto importante que deve ser levado em conta é a presença de resultados falso-positivos, devido à colonização do trato respiratório por este fungo. Os testes diagnósticos que detectam ácidos nucleicos de *Aspergillus* por PCR foram propostos e padronizados para utilização em sangue, tecidos obtidos por biopsia e lavados broncoalveolares. Os valores, preditivo positivo e negativo de PCR, em amostras de sangue e no lavado broncoalveolar variam de 67 a 100% e 55 a 95%, respectivamente. Essas diferenças ocorrem devido ao tipo de ensaio e aos pacientes avaliados. A PCR não pode diferenciar colonização de infecção.

Resultados falso-positivos foram registrados em lavado broncoalveolar (LBA) devido à presença transitória de conídios no trato respiratório. O uso de sangue, soro e plasma é preferível ao de espécimes do trato respiratório. PCR foi o indicador mais precoce de aspergilose invasiva em pacientes leucêmicos, com resultados prévios aos achados clínicos e radiológicos. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo da PCR-ELISA para a detecção de DNA específico para espécies de *Aspergillus* em pacientes com aspergilose invasiva foram de 66, 96, 62,5 e 97%, respectivamente. Os resultados mostraram que a média de tempo da manifestação clínica foi de 39 dias e o tempo médio de positividade do teste molecular (tempo de infecção) foi de 17,7 dias. Portanto, em clínicas de doenças infecciosas o monitoramento de pacientes com o teste molecular poderá ajudar no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas na fase inicial da infecção antes de manifestações clínicas.

A combinação de PCR com técnicas para detectar moléculas de galactomanana em soro ou lavado broncoalveolar é útil para diagnosticar aspergilose invasiva em pacientes com doença hematológica. A sensibilidade do teste foi de 83,3% e o valor preditivo, de 97,6%. Por outro lado, a associação do teste



de galactomanana com o de amplificação e sequenciamento de DNA resultou em 100% de sensibilidade.

O desenvolvimento do teste ELISA para aspergilose invasiva demora 2 a 3 h e o método de PCR, 24 h para ser concluído, devido ao extenso processo de extração, que, no entanto, tende a ser minorado devido aos sistemas avançados disponíveis hoje em dia.

O desenvolvimento de técnicas de hibridização *in situ* pode também auxiliar no diagnóstico, pois estas detectam *A. fumigatus* em tecidos infectados.

### Zigomicose

A zigomicose é um processo infeccioso causado por fungos que apresentam hifas sem septos ou cenocíticas. São fungos sapróbios do solo, vegetais, fezes de animais, alimentos e de insetos, pertencentes à divisão Zygomycota e ordens Mucorales e Entomophthorales. Os primeiros causam mucormicose, doença geralmente aguda e grave, quase sempre oportunista, e os segundos podem causar a entomoforomicose, doença geralmente crônica que atinge indivíduos aparentemente imunocompetentes.

A mucormicose, infecção causada por membros do subfilo Mucoromycotina, é rara, mas muitas vezes requer ação imediata, com base em um diagnóstico preciso. A mucormicose só ocorre em cenário favorável, resultante da interação de condições predisponentes do hospedeiro e circunstâncias que permitam a entrada do fungo no organismo humano. Com raras exceções, os zigomicetos são fungos capazes de produzir infecção em pacientes imunocompetentes. A mucormicose é, portanto, uma doença tipicamente oportunista, que se desenvolve preferencialmente em pacientes com cetoacidose, sob terapias imunossupressoras ou antibioticoterapia massiva de amplo espectro. Pode ainda estar associada a outras condições, como doença hematopoética, transplante de órgãos, insuficiência renal, cirrose, desnutrição proteico-calórica, traumatismo, mieloma múltiplo, tumor sólido e AIDS.

O aumento observado nos últimos anos pode ser atribuído ao crescente número de pacientes com fatores de risco, como diabetes, neutropenia ou transplante de medula óssea e o uso prolongado de esteroides. As principais formas clínicas da mucormicose são as rinocerebrais, pulmonares e gastrintestinais. A porta de entrada mais comum é a via respiratória, mas as vias orais e cutâneas também são formas de ingresso. A idade média dos pacientes é de 40 anos, 65% do sexo masculino. A mortalidade e a prevalência global são de 36% e 44%, respectivamente, para diabetes, 19% e 35%, respectivamente, para nenhuma condição subjacente, e 17% e 66%, respectivamente, para condição de malignidade. Os tipos mais comuns de infecção são sinusal (39%), pulmonar (24%) e cutânea (19%). A mortalidade varia de acordo com o local da infecção: 96%, 85% e 76%, respectivamente, em pacientes com doença disseminada, infecção gastrintestinal e infecção pulmonar.

Infecções hospitalares por zigomicetos podem ocorrer, mas são raras. A exposição de pacientes hospitalizados aos agentes da mucormicose pode ser favorecida por obras de construção civil executadas dentro do ambiente hospitalar. Desde a década de 1970, trabalhos de pesquisa alertam que a poeira causada por obras e reformas aumenta o risco para mucormicose e outras infecções fúngicas em pacientes suscetíveis. Fitas cirúrgicas adesivas podem estar contaminadas com esporos de zigomicetos e representam também importante fonte de infecção cutânea em pacientes no período pós-operatório. Lesões pustulosas, ulcerativas e necrosantes podem ser formadas no local onde foram aplicadas as fitas. A oclusão facilita a pene-

tração do fungo e a invasão da epiderme por meio de fatores como calor, pressão e maceração, favorecendo, desse modo, o desenvolvimento de lesões localizadas. A introdução de zigomicetos diretamente na corrente sanguínea pode ocorrer por contaminação na aplicação de substâncias intravenosas, o que resulta muitas vezes em infecção do sistema nervoso central (SNC). Com frequência, a infecção se restringe a essa localização, sugerindo assim que o tecido cerebral proporcione o desenvolvimento do fungo.

Em usuários de drogas, o efeito sinérgico de anfetamínicos sobre zigomicetos da ordem Mucorales pode explicar o padrão característico de infecção do SNC neste grupo de pacientes. Drogas estimulantes causam vasoconstrição e podem, assim, comprometer a microvascularização em geral. Por sua vez, esses fungos são propensos a invadir paredes de vasos sanguíneos, o que resulta em inflamação e contribui para a falência da microvascularização e consequente lesão do SNC.

*Rhizopus arrhizus* (*R. orizae*) é responsável por cerca de 60% dos casos humanos de zigomicose dos quais foram realizadas culturas e por 90% das formas rinocerebrais. Outras espécies e gêneros, como *Lichtheimia* (*Absidia*) e *Rhizomucor*, são também importantes patógenos de infecção humana. Espécies de *Mucor* são menos frequentes como agentes dessa doença, apesar de vasta literatura sobre mucormicose identificar o zigomiceto frequentemente, mas erroneamente, como *Mucor*. Casos esporádicos de infecção por outros Mucorales, como *Mortierella*, *Cunninghamella*, *Saksenae* e *Apophysomyces*, são descritos na literatura. *Cokeromyces recurvatus* foi descrito várias vezes, mas apenas como contaminante de secreções humanas. Os agentes da entomoforomicose são *Basidiobolus ranarum* e *Conidiobolus coronatus*.

A zigomicose subcutânea, ou entomoforomicose, é geralmente causada por membros da ordem Entomophthorales, especialmente *Basidiobolus ranarum* (*B. haptosporus* anteriormente) e *Conidiobolus coronatus*. A entomoforomicose causada por *Conidiobolus coronatus* afeta principalmente a mucosa nasal e faringe, com posterior invasão do tecido subcutâneo e muscular, enquanto a causada por *Basidiobolus ranarum* envolve o tecido subcutâneo e os músculos, principalmente das extremidades. *Basidiobolus* e *Conidiobolus* spp. são mais comumente encontrados em climas tropicais. *Basidiobolus* spp. está associado a vegetação em decomposição, insetos, bichos e fezes de muitos animais. *Conidiobolus* spp. são encontrados em solos e detritos vegetais, especialmente em climas quentes e úmidos. As infecções causadas por Entomophthorales geralmente ocorrem em pessoas imunocompetentes, em contraste com casos raros de infecção subcutânea causada por membros da ordem Mucorales, que muitas vezes afetam pessoas imunossuprimidas. Conidiobolomicose geralmente ocorre nos homens envolvidos em agricultura e outros tipos de trabalho ao ar livre, com uma proporção de 8:1 dos homens infectados para as mulheres. Basidiobolomicose geralmente ocorre em crianças com menos de 10 anos de idade e é mais comum em meninos.

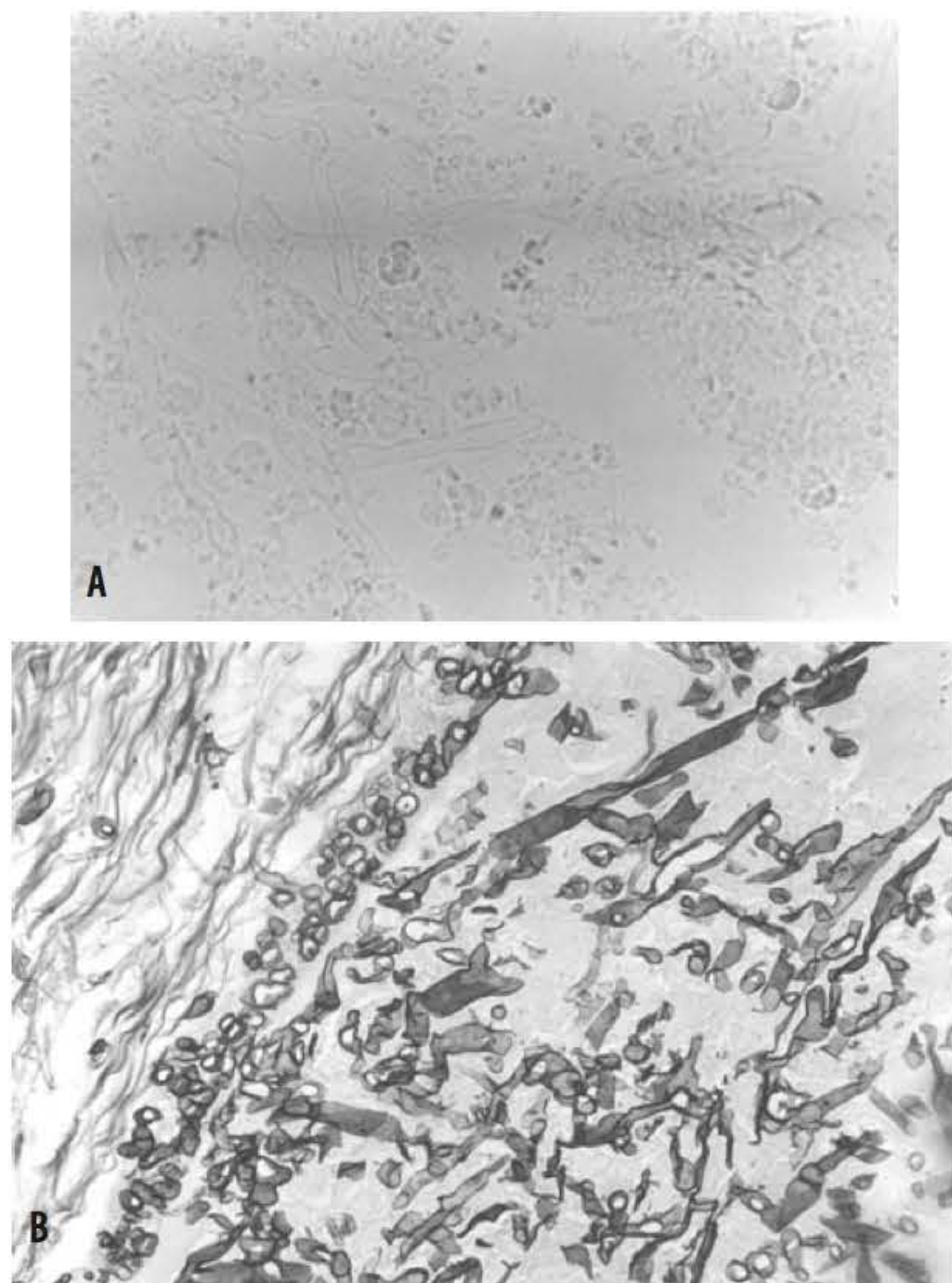
A maioria dos casos na América Latina foi relatada no Brasil, no litoral da Região Nordeste, mas infecções também têm sido descritas na Costa Rica, Colômbia e Porto Rico. Foram relatados casos de infecções por *C. coronatus* em adultos que vivem nas Regiões Nordeste e Centro-Oeste.

### Diagnóstico laboratorial

#### Exame direto

Apesar do caráter oportunista dos zigomicetos, este grupo de fungos pode permanecer no organismo humano apenas coloni-





**Figura 32.32** Zigomicose: **A.** Hifas cenocíticas, a fresco (400 x). **B.** Hifas cenocíticas, impregnação pela prata (400 x).

zando exsudatos de ulcerações, tecidos necrotizados ou secreções de mucosas. O conhecimento desse fato tem muita influência na interpretação de resultados de exames micológicos.

A limitação entre os estados de colonização e invasão, isto é, infecção, não é fácil e deve ser feita por demonstração do fungo no tecido. É sempre necessário observar a presença de hifas cenocíticas no tecido – pois elas demonstram a invasão tecidual pelo fungo – para afastar a hipótese de contaminação por zigomicetos, dada a ubiquidade desses fungos. Entretanto, também devem ser realizados cultivos de amostras biológicas para o estabelecimento acurado do agente etiológico da infecção.

A pesquisa de zigomicetos pode ser realizada em vários materiais clínicos: exsudatos de lesões de mucosa e úlceras de pele, tecidos necrosados ou outros, aspirados de seios maxilar e paranasal, secreções do trato respiratório. A microscopia do material visa à observação de hifas hialinas largas com diâmetro médio de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , parede grossa e refrátil, raramente septadas, mostrando dilatações focais e irregulares com até 50  $\mu\text{m}$ , ramificando-se em ângulo de 90° ou eventualmente, em dicotomia (Figura 32.32). Em cortes histológicos corados com HE, apresentam citoplasma irregularmente corado. Algumas espécies de *Mucor* podem assumir a fase leveduriforme sob certas condições. Nesta forma, o fungo já foi visualizado em urina e fezes humanas.

Sugestão para resultado de exame direto positivo: presença de hifas não septadas características de zigomicetos.

#### Isolamento, cultura e identificação

O cultivo do material biológico permite o rápido e abundante crescimento de culturas branco-acinzentadas, sem pigmento no verso da colônia, nas primeiras 24 h. Os agentes de mucormicose podem crescer na maioria dos meios, mas ágar Sabouraud-dextrose (glicose a 4%, peptona a 1%, ágar a 2%) ou

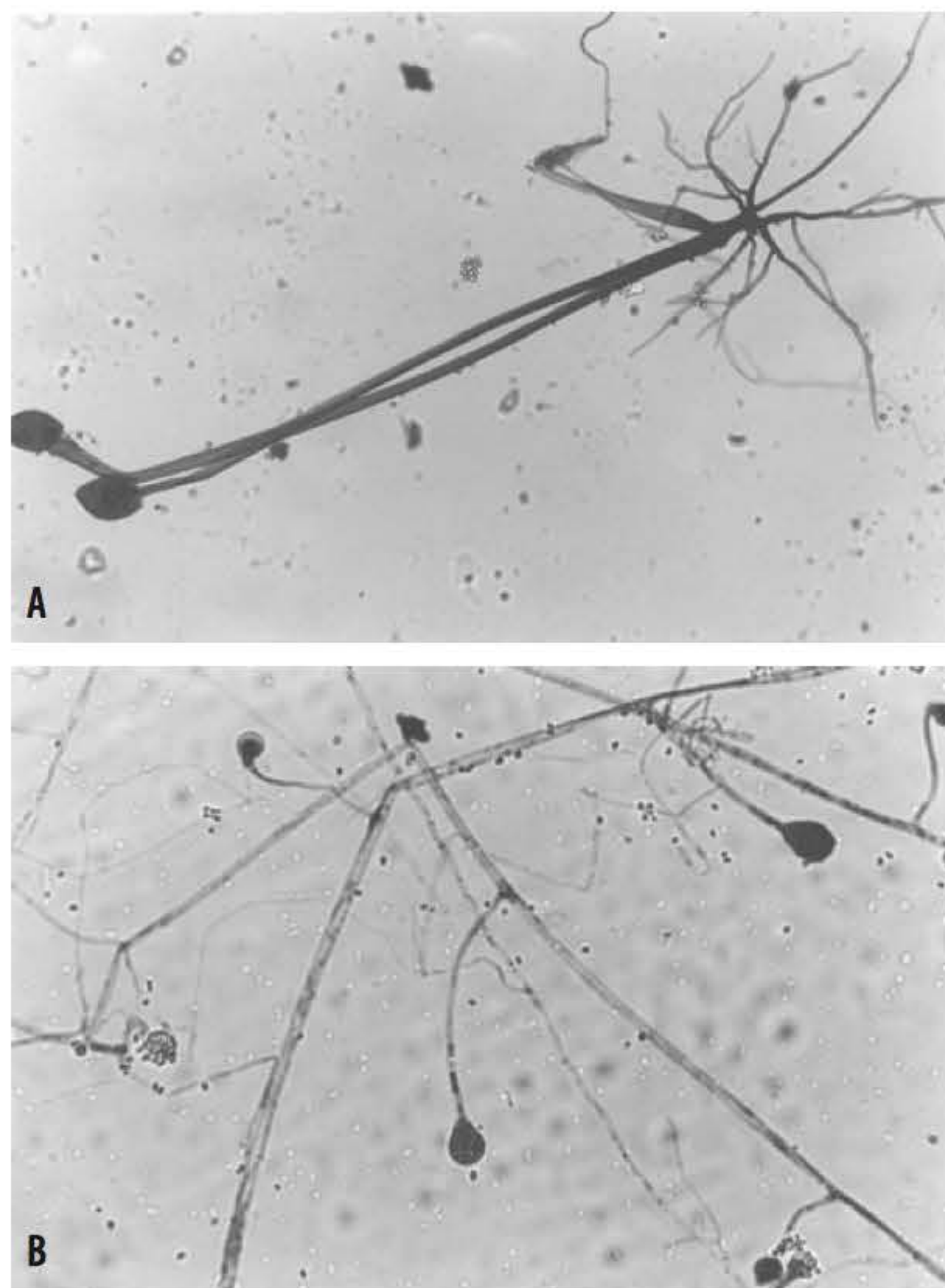
ágar extrato de malte a 4% (extrato de malte a 4%, ágar a 2%) são recomendados. Meios com cicloeximida não devem ser usados. A coleta com *swab* de palato ou das narinas deve ser evitada, e a refrigeração reduz também a viabilidade dos agentes. A incubação deve ser feita à temperatura ambiente e a 37°C.

Material de casos com mucormicose gástrica dificilmente permite o crescimento do agente etiológico, e o diagnóstico é apoiado, nesses casos, no exame direto do espécime clínico. A observação da esporulação dos zigomicetos é vital para sua identificação, porque as chaves de classificação baseiam-se, quase que exclusivamente, em suas estruturas reprodutivas anamorfias (assexuadas).

Depois de isolado, o fungo deve ter sua identificação preferencialmente realizada por especialistas. A esporulação máxima nem sempre é obtida em meios usuais em micologia. Além disso, é necessário observar detalhadamente a sua micromorfologia. Os critérios micromorfológicos principais para a identificação de zigomicetos são:

- Tipo e número de esporangiósporos
- Estruturas de apoio aos esporangióforos
- Presença, ou não, de esporangióforos ramificados
- Forma da columela ou dilatação apical do esporangióforo
- Presença, ou não, de rizoides ou hifas estreitas em forma de raiz vegetal.

Esses aspectos morfológicos definem os gêneros dos zigomicetos. Rizoides ocorrem nos gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor* e *Absidia*. Os esporângios em *Saksenae* têm forma típica de frasco com columela pequena e globosa, enquanto a columela de *Mucor* é alongada e os esporangiósporos são de pequeno tamanho. *Conidiobolus* forma conidióforo simples com conídio único terminal esférico, com 10 a 25  $\mu\text{m}$  e papila proeminente (Figura 32.33).



**Figura 32.33** Aspectos morfológicos de agente de zigomicose: **A.** *Rhizopus* sp. (rizoide e esporangióforo). **B.** *Rhizopus* sp. (columela e esporângio) (400 x).



Provas fisiológicas são também esporadicamente necessárias, e para espécies heterotáticas utilizam-se provas para cruzamento interamostras, visando à reprodução sexual para concluir a classificação do fungo.

#### Testes sorológicos e moleculares

Para auxiliar no diagnóstico pode-se lançar mão de provas de imunodifusão em gel de ágar ou testes imunoenzimáticos, mas eles são pouco utilizados. Há necessidade do desenvolvimento de antígenos específicos e anticorpos monoclonais, bem como de métodos moleculares, para tornar o diagnóstico mais precoce.

## ► Fungos demácios

Infecções micóticas causadas por fungos demácios incluem cromoblastomicose, micetoma, feo-hifomicose e esporotricose. A seguir serão descritas essas doenças, e um item em separado está dedicado aos micetomas.

As paredes celulares dos conídios e das células vegetativas dos fungos demácios apresentam cor marrom a olivácea ou preta. Este pigmento escuro é causado pela deposição de melanina. Em alguns fungos, a demonstração deste composto só foi evidenciada em cultura. Esses patógenos são ubiquitários e cosmopolitas, sendo encontrados frequentemente associados ao solo e plantas, mas ocasionalmente podem causar infecções no homem e em pequenos animais.

### ■ Cromoblastomicose

A cromoblastomicose é micose crônica dos tecidos cutâneos e subcutâneos, em geral, com localização nos membros inferiores. Apresenta-se sob a forma de nódulos ou verrugas que posteriormente podem ulcerar, terminando quase sempre em hiperacantose e hiperqueratose dos tecidos envolvidos.

A cromoblastomicose é causada por diferentes fungos, que são idênticos em sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro. Vários fungos demácios estão envolvidos com a etiologia da doença, mais comumente *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*. Mais de 70% dos casos são autóctones para climas tropicais e subtropicais. *F. pedrosoi* é encontrada em zonas tropicais úmidas, enquanto *C. carrionii* geralmente é o patógeno predominante em regiões secas ou semidesérticas. Menos frequentes são *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala dermatitidis* e *F. monophora*, bem como *E. jeanselmei* e *E. spinifera*. Todos esses agentes pertencem a uma única ordem de fungos ascomicetos, Chaetothyriales.

A cromoblastomicose foi diagnosticada em todos os continentes, embora a maioria dos casos se encontre nas regiões tropicais e subtropicais da América e África. Essa doença é bastante comum no México e o fungo mais isolado é *Fonsecaea pedrosoi*, espécie também mais isolada no Brasil, e na Venezuela é *Cladophialophora carrionii*.

A cromoblastomicose é uma doença rural encontrada geralmente em adultos do sexo masculino (proporção 5 a 9:1), nas faixas etárias de 30 a 50 anos, e raramente ocorre em crianças. Não existe clara predileção racial. No Brasil, o número médio anual de casos de cromoblastomicose relatados variou de 2,6 a 6,4, dependendo da região. Não está relacionada com contágio inter-humano ou transmissão animal-homem. A transmissão ocorre por via traumática, por meio

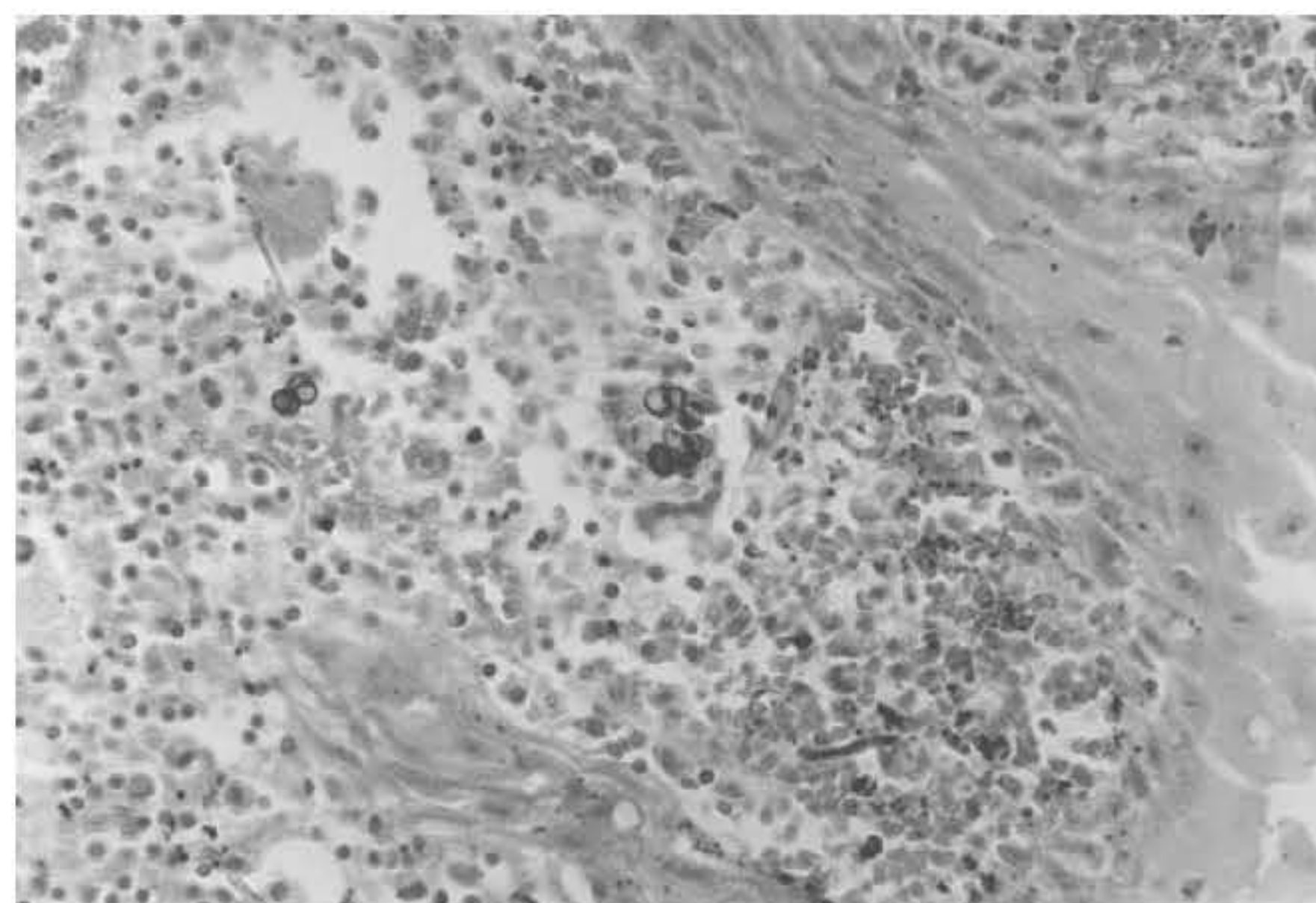


Figura 32.34 Cromoblastomicose. Células escleróticas, HE. (400 ×).

de soluções de continuidade; daí a frequência das lesões nos membros inferiores e superiores. Uma fonte potencialmente importante de infecção na Região Amazônica é a coleta e processamento do coco babaçu, cuja casca pode ser colonizada por *F. pedrosoi*. A cromoblastomicose é considerada uma doença ocupacional e acomete trabalhadores rurais, madeireiros ou vendedores de produtos agrícolas. As pessoas afetadas geralmente sofrem falta de proteção adequada em relação a calçado e vestuário.

### Diagnóstico laboratorial

O laboratorista deve ter especial atenção na coleta de lesões de pele coberta de “pontos negros”. Essas lesões consistem em pequenas crostas hemáticas que contêm restos celulares e estruturas fúngicas, resultantes da sua eliminação transepitelial. A área com “pontos negros” deve ser preferencialmente selecionada para a coleta de amostras. Todos os materiais suspeitos, inclusive raspado de pele, crostas, fragmentos, aspirados e fragmentos de tecido, podem ser analisados. Apesar de o exame direto a fresco, com KOH 20 a 40%, ser método rápido de diagnóstico, também é utilizada biópsia em coloração de hematoxilina-eosina. O diagnóstico laboratorial é relativamente fácil desde que, ao exame direto a fresco, depois da digestão do material sejam observadas células escleróticas ou muriformes de cor marrom, características. Esses corpos constituídos de várias células subglobosas de parede grossa, divididos por septação em mais de um plano, ocorrem isoladamente, ou em pares ou em cachos. Em material de crostas ou escamas superficiais, podem-se visualizar em exame direto também hifas curtas e ramificadas de cor marrom com 2 a 5 µm (Figura 32.34). Os corpos escleróticos são encontrados em pus e tecidos subcutâneos e da epiderme, dentro de células gigantes, raramente em macrófagos ou em leucócitos polimorfonucleares.

A observação de células muriformes em amostras clínicas é obrigatória para a confirmação da doença. A adição de calcoflúor branco pode ser útil quando as células fúngicas forem escassas. Este reagente fluorescente demonstrou aumentar a sensibilidade da detecção de muitos fungos, mas a utilidade no caso de fungos pigmentados permanece obscura.

Resultado em exame direto positivo: presença de células escleróticas ou muriformes características de cromoblastomicose.



## Cultura

Os espécimes clínicos são semeados em meios básicos como ágar Sabouraud adicionado de antibióticos. Os fungos crescem bem a 30°C, mas são de crescimento lento, mostrando colônias visíveis somente após 1 semana, com crescimento máximo em até 4 semanas. Após o isolamento, deve-se verificar se o isolado está em cultura pura. Isso é extremamente importante, pois fungos demácios são polimórficos e a cada transformação morfológica surge a suspeita de contaminação. As características morfológicas e coloniais são obtidas em culturas com aproximadamente 2 semanas a 25 a 30°C em meio de ágar batata-dextrose ou ágar fubá, adequados para esporulação. Para a correta identificação desses agentes, deve-se preparar microcultivos nesses meios de cultura.

O estudo da conidiogênese resultou na redefinição de muitos gêneros de importância médica. Conídios originam-se em hifas especializadas ou ramificadas chamadas conidióforos. As células que dão origem ao conídio são denominadas células conidiogênicas. A distinção entre as várias células é importante para a identificação dos fungos demácios. A fiálide é uma célula conidiogênica que forma internamente uma sucessão de conídios no ápice, geralmente em forma de frasco. Uma estrutura em forma de cálice ou xícara, denominada colarete, pode estar presente no ápice da fiálide. O anelídeo é uma célula conidiogênica caracterizada por anelações no ápice que se torna mais longo e mais estreito à medida que forma os conídios. Alguns fungos produzem conídios por um processo de brotamento. Tais conídios são denominados blastoconídios e podem ocorrer em forma isolada ou em cadeias. O termo basípeta é usado para informar que o novo conídio é formado na base da cadeia e acrópeta no ápice da cadeia.

Fungos demácios de importância médica formam os conidióforos do tipo simpodial, denominado rinocladiela; neste tipo, o conídio forma-se no ápice do conidióforo que se distende para formar novos conídios. O conidióforo fica com a aparência de “cajado nodoso”.

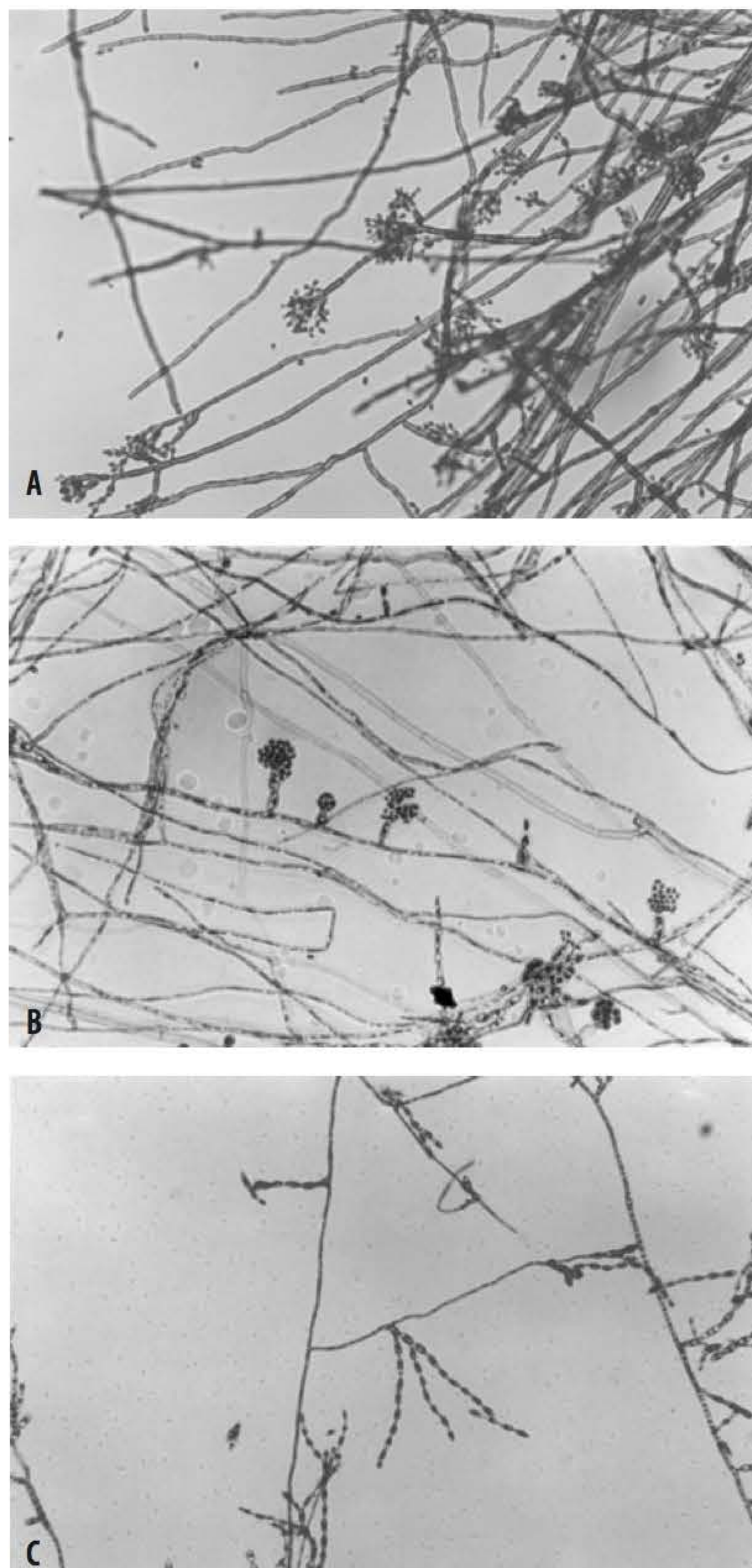
Alguns fungos demácios são conhecidos por produzirem mais de uma estrutura assexuada ou anamórfica. Exemplo da natureza polimórfica é *Fonsecaea pedrosoi*, que pode formar células conidiogênicas do tipo simpodial, dos tipos fialídico ou *Phialophora*, além de cadeias ramificadas de blastoconídios (do tipo *Cladosporium*). *P. verrucosa* produz predominantemente o tipo fialídico; *F. pedrosoi*, como dito anteriormente, pode produzir os três tipos, sendo mais frequente a visualização dos tipos *cladosporium* e *Rhinocladiella*; *C. carrionii* geralmente produz o tipo *Cladosporium* (Figura 32.35).

Recentemente, foi descrita como de valor diagnóstico a fração imunodominante de 54 kDa em soro de pacientes com cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi*. Um estudo empregou o teste de ELISA usando antígeno AgSPP de *C. carrionii* e, em alguns casos, o teste foi útil para a análise da evolução do tratamento e recomendado para estabelecer critérios de remissão.

Métodos moleculares para a identificação dos agentes da cromoblastomicose foram usados, empregando PCR dupla com iniciadores universais e específicos da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico de *Fonsecaea* spp. e também oligonucleotídeos específicos para a identificação de *C. carrionii*.

## ■ Feo-hifomicose

Feo-hifomicose, termo proposto por Ajello em 1974, inclui as infecções por fungos da classe Hyphomycetes,

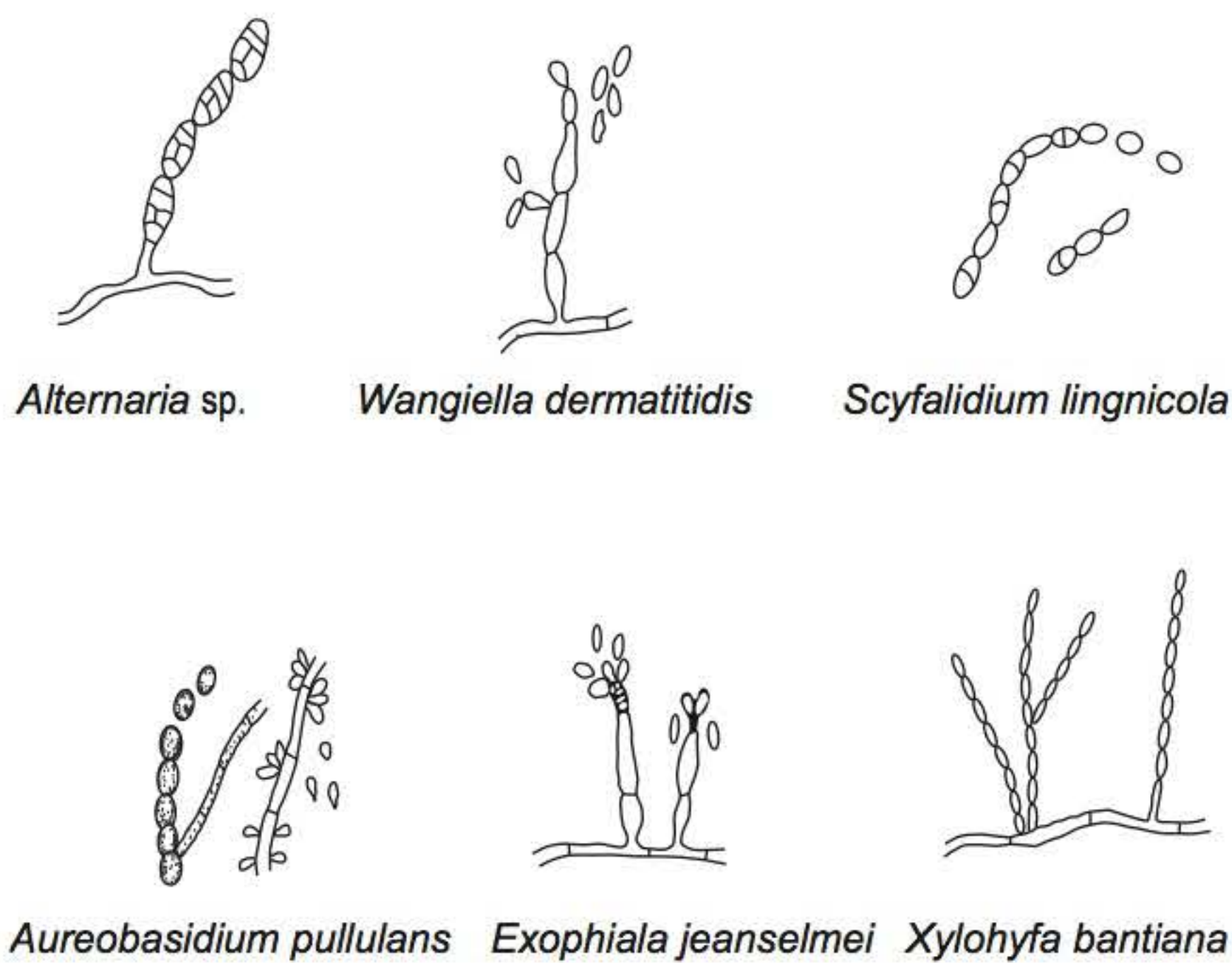


**Figura 32.35** Agentes de cromoblastomicose: **A.** *Fonsecaea pedrosoi* (400 ×). **B.** *Phialophora verrucosa* (400 ×). **C.** *Cladosporium carrionii* (400 ×).

família Dematiaceae. A feo-hifomicose pode ser causada por vários gêneros e espécies de fungos fitopatógenos ou sapróbios do ar, de águas poluídas, solo e vegetais. Este grupo de fungos caracteriza-se por apresentar pigmentos escuros que são, por isso, denominados fungos demácios. No tecido do hospedeiro os fungos se apresentam sob a forma de leveduras hialinas ou acastanhadas, septadas, com hifas pouco desenvolvidas. Esses aspectos, ao lado dos aspectos clínicos, são fundamentais para a divisão estabelecida entre feo-hifomicose e cromoblastomicose. Eventualmente, corpos muriformes (característicos de cromoblastomicose) podem ser vistos em feo-hifomicose ao lado de outras estruturas fúngicas.

Os fungos demácios compreendem cerca de 40 espécies, mas poucas estão associadas à infecção humana (Figura 32.36). As mais comuns são *Exophiala jeanselmei*, *E. moniliae*, *E. spinifera*, *Phialophora* spp. (*Phaeoacremonium*), *Bipolaris* spp.





**Figura 32.36** Representação esquemática dos principais fungos agentes de feo-hifomicose.

e *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* e, menos comumente, *Veronaea botryose*, *Exserohilum rostratum*, *Colletotrichum crassipes* e *Phoma cava*. As infecções ocorrem esporadicamente, muitas vezes em homens adultos mais velhos que trabalham como agricultores, carpinteiros ou exercem outras profissões que os expõem a materiais vegetais. A maioria das infecções de feo-hifomicose ocorre em pessoas imunocompetentes, mas, com o aumento do número de pessoas imunossuprimidas iatrogenicamente, as infecções foram relatadas com frequência crescente em transplantados. Devido ao seu caráter ubiqüitário, muitos desses fungos podem contaminar culturas em laboratório.

A feo-hifomicose, assim como outras infecções fúngicas, apesar de ter grande importância na medicina contemporânea, necessita de apoio laboratorial e clínico para seu diagnóstico definitivo e diferencial de cromoblastomicose.

Os aspectos clínicos da feo-hifomicose são diversos. Infecções subcutâneas – micetomas – caracterizadas por tumefação, formação e drenagem de secreções com grânulos escuros podem ser causadas por esses fungos. Apesar disso, os micetomas não são classificados dentro de feo-hifomicose devido aos diferentes aspectos clinicolaboratoriais.

A feo-hifomicose pode ser, conceitualmente, dividida em quatro tipos clínicos:

- **Superficial:** infecção restrita ao extrato córneo, sem ocorrência de reação tissular. Exemplos: piedra preta, tinha negra (ver Micoses superficiais)
- **Cutaneocorneal:** invasão do tecido queratinizado, com resposta tissular moderada
- **Subcutânea:** cistos que se desenvolvem após inoculação por traumatismos
- **Sistêmica:** infecção disseminada em órgãos internos, geralmente a partir de foco pulmonar.

Também é aceita a hipótese de ocorrência de infecção pulmonar alérgica análoga à aspergilose por fungos demácios.

De modo geral, a feo-hifomicose tem amplo espectro, mas, em alguns casos, pode tornar-se limitada conforme o agente causal. Assim, *Exophiala jeanselmei* e *E. dermatitidis* produzem cistos subcutâneos. A infecção tende a permanecer localizada, mas pode, raramente, disseminar-se em pacientes imunossuprimidos. Outros agentes de feo-hifomicose, quando introduzidos inadvertidamente, por injeção de insulina subcutânea,

em pacientes diabéticos, causam infecção restrita ao local de aplicação. Como os feo-hifomicetos são fungos distribuídos na natureza, sua inoculação accidental por materiais perfurocortantes contaminados com vegetais ou solo pode levar à feo-hifomicose subcutânea em indivíduos imunocompetentes.

Vários tipos de infecções do sistema nervoso central (SNC) podem ser causados por fungos melanizados. Os principais são *Cladophialophora bantiana*, *Exophiala dermatitidis*, *Ramichloridium mackenzie* e *Ochroconis gallopava*. O fungo *Cladophialophora bantiana*, presente em vegetais, pode causar, em indivíduos imunocomprometidos, infecção do SNC, pois é francamente neurotrópico. Alguns pacientes podem apresentar cromoblastomicose prévia à infecção cerebral, enquanto outros apresentam infecção pulmonar e, em casos raros, nenhuma infecção precedente. A maioria dessas infecções é fatal. A ressecção das lesões em combinação com a terapia antimicótica pode reduzir a mortalidade. As infecções atingem o SNC tanto por via hematogênica quanto por extensão direta dos seios paranasais colonizados ou do canal do ouvido, ou por inoculação direta durante procedimentos neurocirúrgicos.

Espécies de *Alternaria*, *Exserohilum*, *Bipolaris*, *Curvularia* e *Cladophialophora* são agentes de feo-hifomicose na forma clínica de seiosite, que pode evoluir para a destruição óssea da região orbital ou, em certos casos, invadir a porção intracranial, o que resulta em lesão do SNC. Seiosite é a manifestação inicial mais comum da feo-hifomicose em indivíduos atópicos. Desse modo, indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver a infecção subsequentemente à seiosite.

Feo-hifomicose cutânea é a proliferação de fungos demácios em tecidos queratinizados. É frequente a localização plantar, na qual fissuras e eczemas facilitam a colonização transiente dos fungos. Em muitos casos a colonização é totalmente benigna, mas, em outros, os feo-hifomicetos contribuem para o agravamento da lesão como agente irritante secundário. Os agentes mais comuns são *Alternaria*, *Curvularia*, *Cladophialophora* e *Aureobasidium*. Formas de onicomycose por *Scytalidium*, *Phyllosticta*, *Pyrenochaeta* e *Chaetomium* são também enquadradas nesta categoria.

Diversas espécies de *Curvularia*, bem como *Exserohilum rostratum*, *Exophiala jeanselmei*, *Lasidioplodia*, *Rhizoctonia*, *Tetraploa*, *Botryodiplodia*, *Cladorrhinum bulbillosum* e *Colletotrichum dematium*, são exemplos de feo-hifomicetos que podem causar queratite micótica após traumatismo com lentes ou objetos perfurocortantes.

As formas sistêmicas de feo-hifomicose são raras e dependem, essencialmente, da eficiência da porta de entrada do fungo e do comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, seja por doença subjacente (diabetes, leucemia) ou por terapia imunodepressora. Grande variedade de manifestações clínicas foi relatada em pacientes suscetíveis: artrite, endocardite, meningite, encefalite, osteomielite, pneumonite, esofagite, peritonite e endoftalmite.

A maior parte dos casos publicados de feo-hifomicose ocorre em humanos, entretanto, a doença já foi descrita em diversos animais, tais como sapos, peixes, gado bovino, gatos e tartarugas.

## Diagnóstico laboratorial

### Exame direto

Tecidos obtidos por biópsia, líquidos aspirados de cistos e escamas de pele e unhas são alguns dos materiais biológicos que podem ser examinados para a pesquisa de hifomicetos.



As formas fúngicas observadas ao exame direto podem ser leveduriformes, com hifas septadas e ramificadas em ângulo reto. Apresentam pigmentação acastanhada. Podem ainda apresentar túbulos regulares, irregulares ou distorcidos. É frequente a apresentação de formas mistas, com hifas artrosporadas ocasionais originando artroconídios irregulares e unisseptados.

Sugestão de resultado de exame direto positivo: presença de hifas septadas demácias ou pigmentadas, características de feo-hifomicose.

### Isolamento, cultura e identificação

A cultura do material biológico permite, após um período de 4 a 6 semanas a 25 a 30°C, o crescimento de colônias de cor escura com aspectos variados, conforme o agente etiológico. *Aureobasidium pullulans*, *Scytalidium* sp., *Wangiella dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, *E. spinifera*, *Lecythophora hoffmannii* e *Hortaea werneckii* apresentam crescimento inicial leveduriforme, e passam, gradualmente, a apresentar formas miceliares até se tornarem totalmente filamentosas. Esses feo-hifomicetos são chamados de *yeast-like fungi*, ou fungos semelhantes a leveduras. Os outros agentes crescem lentamente, mas são visíveis em 15 dias como colônias velutíneas, de cor cinza a negra, com pigmento negro no verso, aspectos morfológicos típicos de feo-hifomicetos.

Ocorrem revisões frequentes na taxonomia, o que resulta em reclassificação e atualização da nomenclatura dos feo-hifomicetos. Isso se deve não só ao polimorfismo dos gêneros e espécies, mas também à similaridade morfológica entre espécies em relação às estruturas morfológicas microscópicas. A conidiogênese, análise de exoantígenos e análise genética são tendências nos critérios de classificação dos feo-hifomicetos. A identificação de hifomicetos é difícil e requer consulta a bibliografia e pessoal especializado.

As sequências de nucleotídios dos domínios D1/D2 da grande subunidade (26S) do DNA ribossômico é utilizada na identificação de fungos patogênicos demácias.

## ■ Esporotricose

A esporotricose é uma infecção crônica geralmente limitada aos tecidos cutâneos e subcutâneos ou linfocutânea. A forma clínica sob a qual se apresenta depende de diversos fatores, como o tamanho do inóculo, a profundidade da inoculação traumática, a tolerância térmica da cepa e o estado imunológico do hospedeiro. As partes dos membros superiores e inferiores mais expostas a traumatismos são os locais mais atingidos, mas face e tronco também podem ser acometidos. As lesões são ulcerativas e gomosas, sendo clássica a forma de linfangite nodular ascendente. São também descritas manifestações pulmonares, ósseas, geniturinárias e do sistema nervoso central. Em raras ocasiões, pode disseminar-se para outros órgãos, ou ainda ser primariamente sistêmica, resultante da inalação de esporos. Pacientes com neoplasias do sistema hematopoético ou linforreticular, AIDS, diabéticos, alcoólatras ou sob uso intensivo de substâncias imunodepressoras podem apresentar a forma disseminada da doença.

Atualmente são reconhecidas como espécies válidas *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*, *S. albicans* e *S. lutei*. As duas primeiras estão associadas à infecção humana.

O fungo tem sido encontrado como sapróbio em vegetações, excretas de animais, solo e, mais raramente, em insetos. O complexo *S. schenckii* implanta-se por traumatismo com gravetos ou espinhos vegetais e, ocasionalmente, por inalação

de conídios. *S. brasiliensis* e *S. schenckii* foram as espécies mais virulentas, quando avaliadas em modelo murino, e os mecanismos de lesão podem ser espécie-específicos. A transmissão por meio de mordedura e arranhaduras de animais infectados, ou portadores assintomáticos, é também aceita por diversos pesquisadores. Na cidade do Rio de Janeiro foi descrito um número bastante elevado de casos da doença envolvendo gatos e humanos. Os seres humanos podem ser contaminados por arranhadura do gato ou mordida, e até mesmo por contato com materiais contaminados e líquidos. A esporotricose canina apresenta-se como micose autolimitada, enquanto a esporotricose felina varia de infecção subclínica a doença sistêmica grave, com disseminação hematogênica do fungo. A esporotricose em gatos sempre precedeu a sua ocorrência entre os seus proprietários. O potencial zoonótico dos gatos foi demonstrado pelo isolamento de *S. schenckii* a partir de lesões cutâneas e de material colhido de suas cavidades nasais e orais.

Desde 1998, no Rio de Janeiro e áreas adjacentes do Brasil, muitos casos de esporotricose transmitida zoonoticamente foram relatados por donos de gatos domésticos, veterinários e outros cuja ocupação envolve o cuidado com este animal. Uma análise de 31 casos identificados nesse domínio entre 1988 e 1997 sugeriram que a incidência de esporotricose foi diminuindo entre os residentes rurais e aumentando entre os moradores urbanos que têm como hábito a pesca e a caça.

A hipótese de contágio inter-humano não está comprovada. O período de incubação da doença varia de 3 a 180 dias, com maior frequência de 3 semanas.

Ocupações que predisõem a essa doença incluem jardinagem, agricultura ou qualquer atividade que manipule solo ou vegetação, fontes em potencial. A doença é de ampla distribuição, sendo encontrada principalmente em áreas tropicais e temperadas. O maior número de casos foi descrito no continente americano, principalmente no México.

Pacientes com a forma cutânea localizada são geralmente indivíduos saudáveis, com idade abaixo de 30 anos. Crianças podem também apresentar a doença. Não existe diferença entre as frequências em relação ao sexo. Diversos surtos epidêmicos foram descritos após a exposição de grupos de indivíduos à mesma fonte de infecção.

## Diagnóstico laboratorial

### Exame direto

A esporotricose é uma das raras exceções, em micologia médica, em que o exame direto tem baixa sensibilidade e, portanto, em regra, não é útil para o diagnóstico laboratorial da micose. Formas leveduriformes em navetas ou “charutos” podem ser, eventualmente, vistas ao exame direto do material biológico corado segundo Gram, Gomori ou PAS. Embora a morfologia das células seja peculiar, essas formas são escassas no material biológico. Em exame a fresco, geralmente o exame direto é negativo e inconclusivo.

O método de imunofluorescência direta apresenta melhores resultados e tem boa especificidade. Não existem, porém, reagentes padronizados disponíveis no mercado internacional.

Resultado de exame direto por imunofluorescência ou imunoperoxidase: presença de formas em charuto ou cigarro compatíveis com *Sporothrix schenckii*. Em material obtido por biopsia: observação da reação tissular, corpos asteroides e/ou blastoconídios compatíveis com *Sporothrix schenckii*.



A sequência do gene 18S rRNA pode detectar uma quantidade de DNA de 1 UFC de *S. schenckii* em amostras de tecido. As altas sensibilidade e especificidade do PCR indicam que o ensaio pode fornecer um diagnóstico rápido com precisão suficiente para ser clinicamente útil para pacientes com esporotricose. Os iniciadores empregados no teste de PCR *nested* foram SS1, 5'-CTC GTT CGG CAC CTT ACA CG-3', e SS2, 5'-CGC TGC CAA AGC AAC GCG GG-3', que definem um amplicom de 305 pb e SS3, 5'-ACT CAC CAG GTC CAG ACA CGA TG-3', e SS4, 5'-CGC GGG CTA TTT AGC AGG TTA AG-3', correspondem a 152 pb. Vários patógenos, incluindo bactérias, fungos, *Leishmania* e micobactérias atípicas, são capazes de causar lesões cutâneas do tipo esporotricose, portanto o uso de métodos rápidos é necessário.

### Isolamento, cultura e identificação

O diagnóstico de esporotricose é realizado, em regra, pelo isolamento do fungo de espécimes clínicos, tais como pus ou tecido obtido por biopsia. Materiais obtidos por punção de medula óssea ou sangue de casos de doença disseminada nem sempre permitem o isolamento da amostra.

As principais características fenotípicas para o reconhecimento das espécies são a morfologia dos conídios sésseis pigmentados, o crescimento em 30, 35 e 37°C e a assimilação de sacarose, rafinose e ribitol. Com base na análise do gene calmodulina também se pode realizar a identificação dessas espécies.

*S. brasiliensis* caracteriza-se por ter células conidiogênicas geralmente terminais ou intercalares sobre conidióforos mais ou menos diferenciados e crescimento simpodial dos conídios hialinos. Conídios sésseis são marrons, com paredes espessas, globosos a subglobosos. Esse fungo não cresce a 40°C e foi incapaz de assimilar sacarose e rafinose, e poucas espécies assimilam ribitol; é dimórfico e foi considerado o único membro patogênico deste gênero.

*S. globosa* é incapaz de crescer a 37°C, mas cresce a 35°C e apresenta conídios laterais globosos; não cresce a 40°C e é incapaz de assimilar rafinose; algumas cepas assimilam ribitol.

*S. mexicana* apresenta crescimento simpodial com conídios geralmente hialinos, ovalados. Conídios sésseis são marrons com paredes espessas, predominantemente subglobosos, ou elipsoides. A temperatura máxima de crescimento foi de 37°C, não cresce a 40°C e é capaz de assimilar sacarose, rafinose e ribitol.

O complexo *S. schenckii* é resistente à cicloeximida e cresce bem na maioria dos meios usados em micologia à temperatura entre 25 e 30°C. O pus ou macerado de tecido é semeado em ágar Sabouraud com antibióticos. Culturas desenvolvem-se em poucos dias, como colônias brancas a creme, úmidas, planas, enrugadas, tornando-se marrons ou pretas dentro de 10 dias a 2 semanas. As taxas de isolamento deste fungo são altas. Ágar extrato de malte pode ser usado para manter o pigmento escuro das culturas.

As colônias apresentam hifas hialinas septadas, frequentemente simpodiais. Os conídios são de dois tipos:

- Conídio unicelular, hialino, de parede fina, que se desenvolve ao longo de hifas; conidióforos eretos na forma de cachos
- Conídio unicelular de parede grossa e escura desenvolvendo-se ao longo de hifas. Os conídios hialinos são ovais, elípticos a piriformes e são produzidos em arranjo de roseta ("margarida") no final do conidióforo. Os conídios escuros

são esféricos a ovais (2 a 4 µm). A intensidade da cor da colônia é diretamente proporcional ao número de conídios de parede escura. Esses conídios perdem seu pigmento e se tornam hialinos durante a manutenção no laboratório. Aspectos micromorfológicos de *S. schenckii* podem ser observados na Figura 32.37.

*S. schenckii* apresenta dimorfismo térmico reversível, convertendo-se para a forma leveduriforme a 37°C, com maior rendimento sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Esta forma, porém não apresenta características morfológicas úteis para a identificação do fungo. Para tanto, é observada a fase micelial. Mas a capacidade de conversão à fase L é importante para a diferenciação do agente ante outros fungos anemófilos contaminantes. *Sporotrichum* spp. são fungos anemófilos, não patógenos ao homem e animais, e não apresentam dimorfismo. A conversão da colônia pode ser apenas parcial, com a constatação de áreas brancas e superfície lisa e úmida, formada de células ovais ou alongadas com brotamento.

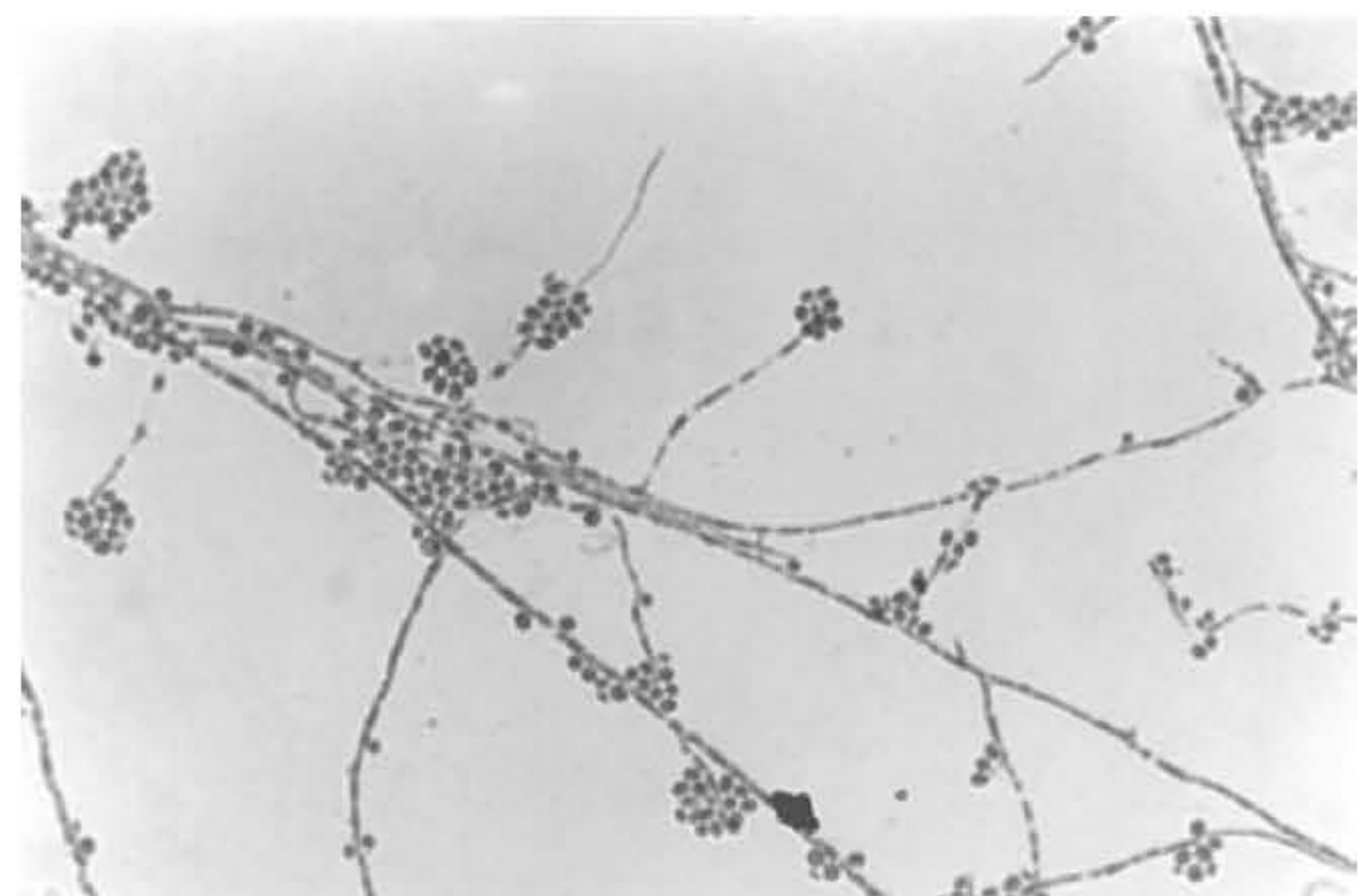
### Diagnóstico sorológico

Várias técnicas, incluindo aglutinação, imunoeletroforese e imunodifusão, têm sido utilizadas para o diagnóstico sorológico da esporotricose cutânea. No entanto, devido à baixa especificidade, reações cruzadas com outras micoses são observadas. Além disso, essas técnicas são menos sensíveis quando comparadas aos testes imunoenzimáticos, que são instrumentos promissores no diagnóstico de várias doenças infecciosas. Antígenos da fase micelial e leveduriforme foram empregados e mostraram sensibilidade que variou de 90 a 97% e especificidade de 80 a 89% no teste ELISA.

### ▪ Micetomas

Micetoma é uma forma clínica que apresenta duas possíveis etiologias: bacteriana ou fúngica. O micetoma actinomicótico é causado por membros do grupo dos actinomicetos, que podem ser anaeróbios ou aeróbios. A doença é conhecida também como actinomicose ou nocardiose. O micetoma eumicótico ou eumicetoma pode ser causado por diversos gêneros e espécies de fungos filamentosos.

O micetoma é uma infecção granulomatosa crônica dos pés, ocasionalmente mãos e outras áreas do corpo. A doença é caracterizada por aumento, tumoração, deformidade, fistu-



**Figura 32.37** Aspectos micromorfológicos de cultura de *Sporothrix schenckii* (400 x).



lização e destruição óssea. É uma infecção dos tecidos cutâneo, subcutâneo e ósseo que se inicia com o endurecimento da área de inoculação, em geral indolor, que posteriormente intumescce e produz abscessos. Os abscessos conectados entre si por ductos sinuosos alcançam a pele e drenam líquidos por meio de múltiplas fístulas. O agente cresce nos tecidos formando estruturas conhecidas como grãos ou drusas. Este, mais purulento em actinomicose e mais seroso em eumicetoma, contém os grãos e constitui o material mais adequado para o diagnóstico laboratorial da doença. Os grãos variam na cor, segundo o agente etiológico; eles podem ser brancos, amarelos, vermelhos ou pretos e são formados por compactação das estruturas do agente etiológico.

Mais de 30 espécies de fungos podem ser agentes de eumicetomas. A doença ocorre mais frequentemente em regiões tropicais e subtropicais e, com menor intensidade, em regiões temperadas. É endêmica na Índia e em alguns países da África e América Latina. Acomete mais homens adultos, entre 20 e 50 anos, e é considerada uma doença ocupacional.

Há pelo menos duas dezenas de espécies de fungos causadores de eumicetoma em todo o mundo, mas a espécie mais prevalente (em aproximadamente 70% dos casos relatados) é *Madurella mycetomatis*, que está associada a micetoma de grão preto. *Scedosporium apiospermum*, responsável por aproximadamente 10% dos casos relatados, produz grãos brancos nos tecidos. Outros agentes etiológicos incluem *Madurella grisea*, *Acremonium falciforme*, *A. kiliense*, *A. recifei*, *Cylindrocarpon cyanescens*, *C. destructans*, *Exophiala jeanselmei*, *Scytalidium dimidiatum*, *Aspergillus nidulans*, *Neotestudina rosatii*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Pyrenochaeta romeroi* e *Phialophora verrucosa*. Eumicetoma geralmente ocorre em uma relação de 5:1 entre homens e mulheres e em adultos com idades entre 20 e 40 anos. A doença é mais comumente vista em pastores e agricultores.

Em geral, a prevalência de micetomas causada por fungos é crescente, com *Madurella* spp. e *S. apiospermum* como as principais causas de eumicetoma na América Latina. Os agentes mais importantes de eumicetoma no Brasil são *Pseudallescheria boydii*, *Madurella grisea*, *M. mycetomatis* e espécies de *Acremonium*. *Pseudallescheria boydii* e *Acremonium* sp. formam grãos brancos a branco-amarelados, e *M. mycetomatis* e *M. grisea* constituem grãos de coloração preta *in vivo*.

Os agentes mais comuns de micetoma actinomicótico são *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri* e *N. asteroides*. Os agentes anaeróbios são *Actinomyces israelii*, *A. bovis*, *A. naeslundii* e outros.

### Diagnóstico laboratorial

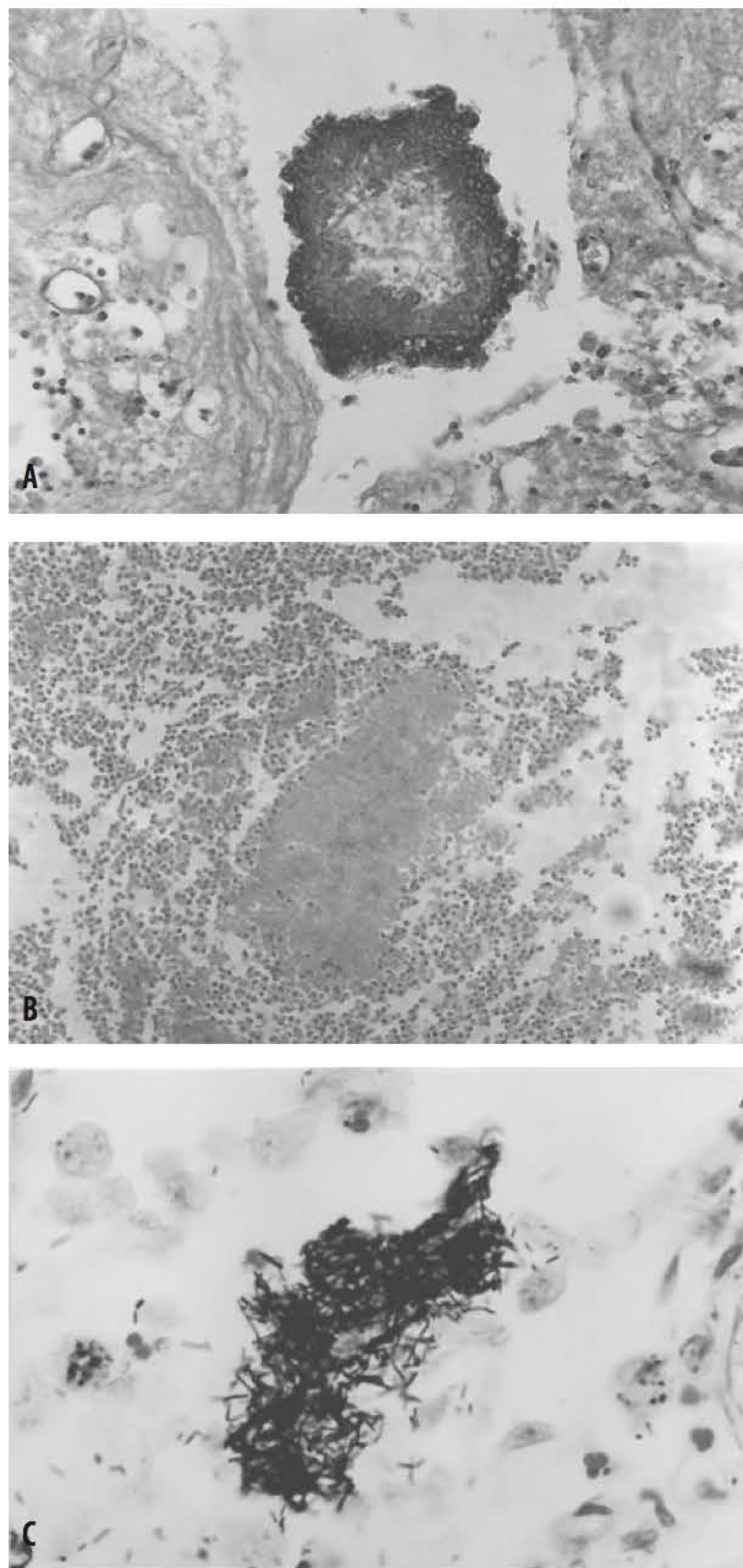
A secreção deve ser colhida das fístulas, com auxílio de gaze embebida em solução fisiológica, alça de platina ou zargatoa (*swab*) esterilizadas; em lesões fechadas sem drenagem da secreção, o médico deve aspirar com agulha e seringa. Pus, material obtido por curetagem ou biopsias devem ser colocados em placas de Petri estéreis.

A secreção retida na gaze ou *swab* deve ser eluída em solução salina estéril e colocada em placas de Petri estéril. Selecionam-se desse material porções com aspecto arenoso que podem conter grãos. Ao exame direto “a fresco”, o encontro de pequenos grãos ovais, irregulares, medindo 0,5 mm a 2,0 mm de diâmetro, permite o diagnóstico de micetoma.

No caso de grão eumicótico são observadas estruturas internas semelhantes a filamentos micelianos (2 a 5 µm de diâmetro), septados e emaranhados, com abundantes clami-

doconídios intercalares (Figura 32.38A). Os grãos podem ser brancos, amarelos, vermelhos ou negros, presumindo o agente etiológico.

O grão actinomicótico, comumente branco-amarelado, não apresenta essas estruturas internas, mas é constituído de massa homogênea de cocos e bacilos com microfilamentos (1 µm de diâmetro) ramificados. O contorno ou periferia dos grãos actinomicóticos, em geral, apresenta formações em clavas. A coloração de Gram permite melhor análise do conteúdo do grão actinomicótico. Colorações de Giemsa, Gomori e Ziehl-Nielsen são também utilizadas, e algumas espécies de *Nocardia* são parcialmente álcool-acidorresistentes (Figura 32.38B). A diferenciação entre as duas etiologias é importante para o tratamento específico com antibióticos antibacterianos ou antifúngicos.



**Figura 32.38** Grão de micetoma: **A.** Eumicótico, HE (400 x). **B.** Actinomicótico HE (1.000 x). **C.** Actinomicótico, col. Brown-Breen (1.000 x).



Resultado de exame direto positivo: grãos compatíveis com actinomicose ou eumicetoma de grãos com coloração amarela (ou vermelha, preta, branca).

### Cultura

Devido à variedade de agentes de micetomas, seu isolamento e sua identificação são da maior importância clínica, especialmente se ao exame direto não for possível a diferenciação entre actinomicetoma e eumicetoma. A identificação de gênero e espécie permite a obtenção de dados relevantes para o conhecimento epidemiológico da doença.

Para o isolamento do agente, utiliza-se ágar Sabouraud com adição de antibióticos antibacterianos se os grãos apresentarem hifas septadas verdadeiras e a suspeita for de eumicetoma. Se os grânulos mostrarem filamentos finos e formas bacilares ou cocoides, é recomendado ágar Sabouraud ou BHI sem antibióticos para o isolamento de actinomicetos aeróbios. Para a obtenção de actinomicetos anaeróbios ou microaerófilos, são necessários meios mais complexos e condições de anaerobiose na incubação. Pode-se usar tioglicolato líquido para transporte da amostra nesses casos.

Os grânulos de fístulas devem ser lavados em salina estéril para reduzir a contaminação. As culturas devem ser incubadas à temperatura ambiente e também a 35°C, por período de até 30 dias. As diversas apresentações das culturas dos variados agentes etiológicos serão descritas a seguir.

No caso de isolamento de fungos, a identificação deve ser realizada com:

- Estudo macroscópico das colônias em ágar Sabouraud e ágar batata
- Observação da temperatura ótima de crescimento
- Estudo dos caracteres microscópicos
- Verificação da atividade bioquímica: ação sobre gelatina, leite, sorocoagulado de Loeffler, auxanograma dos hidratos de carbono (glicose, maltose, sacarose, galactose e lactose) e de fontes nitrogenadas (ureia, asparagina, sulfato de amônio, nitrato de potássio e peptona) e observação da hidrólise do amido.

### Outros métodos

Para auxiliar o diagnóstico, foi desenvolvido anticorpo monoclonal contra um epitopo imunodominante de antígeno de 120 kDa, presente na parede celular de esporos e hifas de *P. boydii* e *Scedosporium apiospermum*. Os MAb podem ser utilizados nas técnicas de imunofluorescência e ELISA sanduíche (DAS-ELISA) para diferenciar com precisão *P. boydii* de outros fungos infecciosos e para controlar o patógeno em amostras ambientais. PCR e sequenciamento da região espaçadora transcrita interna 1 (ITS1) permitem distinguir entre os agentes conhecidos de micetoma.

*Pseudallescheria boydii* é um patógeno capaz de causar colonização assintomática e infecções localizadas e disseminadas. Recentemente, foi demonstrado que a variação genética é alta nas espécies do complexo *P. boydii*. Duas novas espécies, *Pseudallescheria minutispora* e *Scedosporium aurantiacum*, são filogenética e morfologicamente separadas de *P. boydii*.

Os iniciadores específicos 26.1A [5'-AATGAGTTGGGC TTTAACGG-3'] e 28.3A [5'-TCCCGGTAGTGTAGTGT CCCT-3'] são usados para identificar *M. mycetomatis* e um fragmento de aproximadamente 420 pb é demonstrado.

O desenvolvimento de abordagens moleculares melhorou significativamente a sensibilidade e a especificidade na detecção de agentes etiológicos. Especialmente, a análise sistemática de ITS1 ITS2 e região hipervariável D1/D2 é eficaz

na identificação dos fungos patogênicos, enquanto os genes ribossômicos 18S e 28S (o gene 26S em todas as leveduras) são relativamente conservados e são úteis em análises filogenéticas. Cepas com a diversidade de sequência > 1% no domínio D1/D2 ou na região ITS geralmente representam espécies distintas. Assim, *M. mycetomatis* e *M. grisea* pertencem a diferentes ordens de Ascomycetes. *M. mycetomatis* pertence à ordem Sordariales e é provável que *M. grisea* seja um membro da ordem Pleosporales.

### Agentes de micetoma eumicótico

#### Acremonium falciforme

► **Aspecto macroscópico.** O fungo anteriormente conhecido como *Cephalosporium falciforme* cresce lentamente em ágar Sabouraud a 25°C-28°C, produzindo colônia penugenta cuja tonalidade pode variar entre creme, cinza, marrom, rósea e malva. O reverso apresenta tonalidade amarela, rosa a violeta.

► **Aspecto microscópico.** As hifas são hialinas, septadas e ramificadas, e nelas se elevam conidióforos eretos, septados e não ramificados. No ápice dos conidióforos aglomeram-se conídios em forma de salsicha, que medem 1 a 8,5 µm × 2,7 a 3,2 µm, ligeiramente encurvados e não septados. Os conídios agrupados são facilmente dissociados devido à solubilidade da substância mucoide envolvente e da fragilidade desta formação. Podem ser encontrados clamidoconídios terminais e/ou intercalares.

#### Madurella mycetomatis

► **Aspecto macroscópico.** A colônia tem aspecto coriáceo, no início, apresentando sulcos e dobras, com tonalidade amarela ou ocre-marrom, encoberta, em geral, por micélio aéreo, curto e de tonalidade cinza. Este micélio aéreo tende, posteriormente, à tonalidade marrom. Há, então, produção de pigmento marrom que se difunde no meio de cultura. As colônias mais antigas adquirem tonalidade marrom-avermelhada. A produção de esclerócios é estimulada em ágar batata-cenoura. *M. mycetomatis* assimila dextrose, galactose e maltose, mas não sacarose.

► **Aspecto microscópico.** Hifas moniliformes, com 2 a 6 µm de diâmetro, contendo clamidoconídios intercalares (25 µm), são observadas e, após 2 meses, as colônias apresentam esclerócios negros constituídos de elementos micelianos em forma de polígono. Dois tipos de esporulação podem ocorrer em ágar fubá com tween 80: (a) aleuriconídios piriformes (3 a 5 µm), com base truncada, sobre ápice de conidióforos simples ou ramificados; (b) conídios globosos, sobre fiálides pequenas, em forma de botija.

#### Madurella grisea

► **Aspecto macroscópico.** A colônia tem desenvolvimento lento à temperatura de 30°C. Seu aspecto é coriáceo, escuro, sulcado, e fica posteriormente recoberta por micélio aéreo cinza. As colônias em ágar Sabouraud são estéreis, com ocasional presença de clamidoconídios. A assimilação, em meio líquido, de lactose e sacarose separa essa espécie de *M. mycetomatis*. *M. grisea* assimila sacarose, mas não lactose.

► **Aspecto microscópico.** Em meios de cultivo com baixa concentração de nutrientes, desenvolvem-se picnídios com picnidioconídios em seu interior. Algumas amostras produzem picnídios abortivos.

#### Pseudallescheria boydii (Scedosporium apiospermum)

► **Aspecto macroscópico.** O fungo cresce rapidamente, em meios usuais de cultivo. A colônia forma micélio aéreo abun-



dante com aspecto de penugem, a princípio branco e tornando-se castanho-acinzentado. O reverso da colônia mostra hifas aéreas com tonalidade cinza a negra. Raras espécies apresentam colônias membranosas de cor marfim. Temperatura ótima de crescimento na faixa de 30 a 37°C.

► **Aspecto microscópico.** As hifas são hialinas com 1 a 3 µm de diâmetro e são formados aleuroconídios piriformes ou em forma de limão, medindo 4 a 9 µm × 6 a 10 µm, isolados ou em pequenos aglomerados, sobre o ápice de conidióforos simples ou ramificados e/ou ligados lateralmente às hifas (Figura 32.39).

Este fungo é homotático e algumas espécies produzem ascocarpos (forma sexuada) que se localizam abaixo da superfície da colônia, sobre o ágar ou nos sulcos. Os cleistotécios medem 100 a 300 µm de diâmetro, sendo constituídos de células poligonais de parede espessa com tonalidade amarelo-marrom a negra. O cleistotécio rompe-se na maturidade, revelando ascos clavados, evanescentes com 8 ascósporos marrons (4 a 5 µm × 7 a 9 µm).

## Actinomicoses

### Actinomicose de tipo exógeno

A doença é provocada por actinomicetos aeróbios. São bactérias que vivem, principalmente, no reino vegetal e solo rico em matéria orgânica e, se veiculadas por traumatismos para o organismo do homem, implantam-se e determinam manifestações mórbidas.

Em nosso meio, o tipo clássico de actinomicose exógena é a actinomicose podal. Esse aspecto da epidemiologia pode ser explicado pelo fato de muitos colonos, em nosso país, trabalharem descalços e terem, portanto, maior risco de traumatismo nos pés.

Em pequeno número de casos, as lesões actinomicóticas do tipo exógeno se localizam em outras partes do corpo. Tais lesões têm prognóstico mais favorável que a actinomicose do tipo endógeno, pois esta tende a se generalizar com alta taxa de letalidade. No entanto, nocardiose (actinomicose exógena) generalizada, simulando mieloma, provocada por *Nocardia brasiliensis*, foi registrada nos EUA. Casos de nocardiose sistêmica têm sido registrados, produzidos pela *Nocardia brasiliensis* e pela *Nocardia otitidiscaviarum* (*caviae*). As espécies do gênero *Nocardia* da família Nocardaceae formam um grupo homogêneo entre as Corynebacteriaceae, uma subordem da ordem Actinomycetales. A definição presente e geral-

mente aceita de *Nocardia* é fundamentada principalmente na informação filogenética molecular, nomeadamente a partir de sequências do gene 16S rRNA. Existem atualmente mais de 30 espécies de *Nocardia* de significado clínico, com a maioria dos isolados sendo *N. nova complex*, *N. abscessus*, *N. transvalensis complex*, *N. farcinica*, *N. asteroides* tipo VI (*N. cyriacigeorgica*) e *N. brasiliensis*. Essas espécies causam uma grande variedade de doenças e têm padrão de sensibilidade variável. A identificação precisa muitas vezes exige o encaminhamento a um laboratório de referência capacitado a realizar análises moleculares. A correta identificação é importante para reconhecer a relevância clínica de uma espécie e no manejo clínico e tratamento de pacientes com a doença.

### Actinomicose de tipo endógeno

A doença é causada por actinomicetos que vivem saprofiticamente em nosso organismo, mas que, sob determinadas condições, tornam-se patogênicos, ou seja, são agentes oportunistas. Os actinomicetos que determinam tais lesões são anaeróbios ou microaerófilos e vivem nas cavidades naturais do homem e de outros animais, principalmente na boca e nas amígdalas.

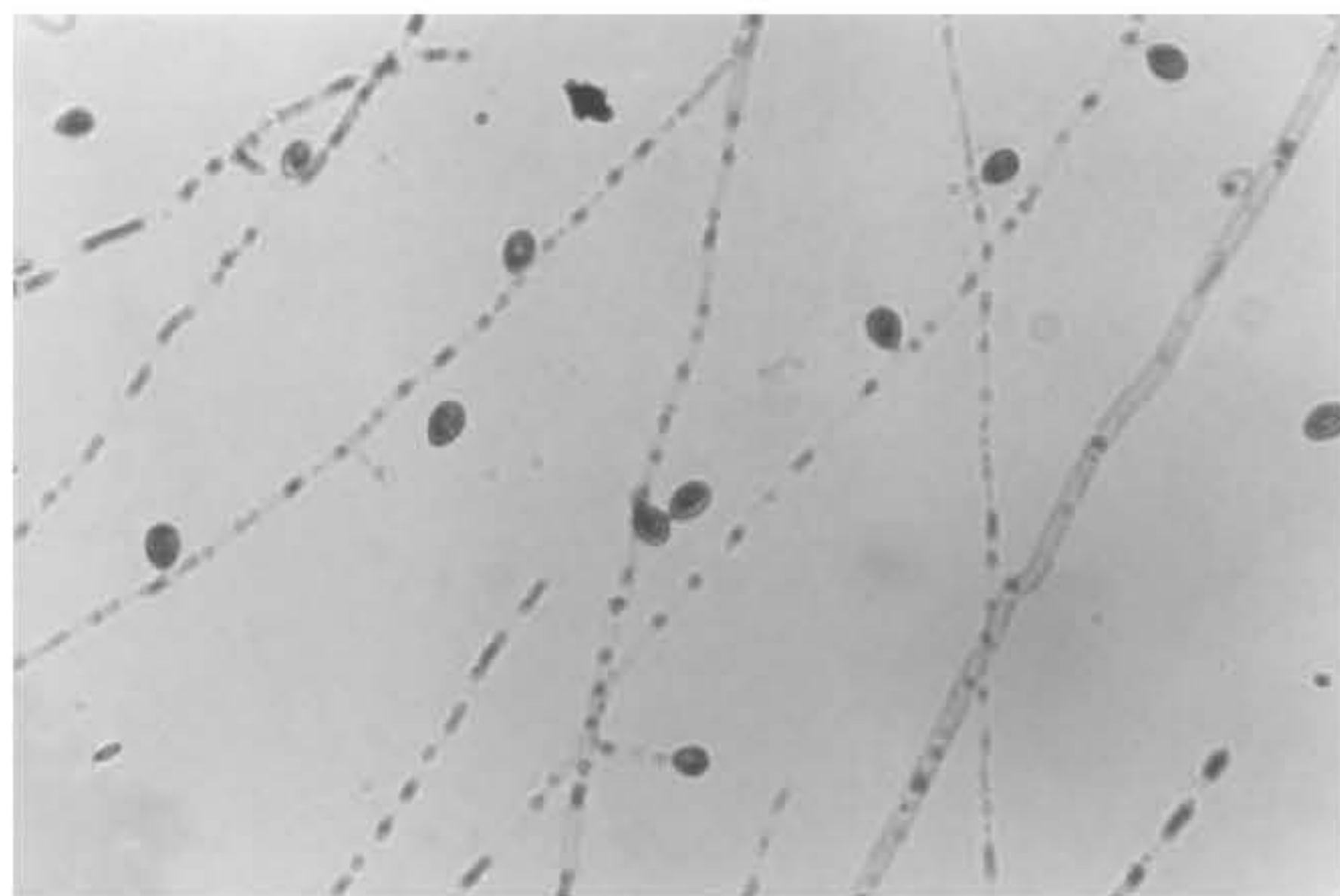
Um dos agentes mais comuns de actinomicose endógena, *A. israeli*, é encontrado em amígdalas de pessoas aparentemente saudáveis, cáries dentárias e criptas tonsilares.

Casos de actinomicose dos órgãos genitais femininos foram descritos e relacionados com dispositivos intrauterinos (DIU), os quais, lesando o endométrio, favorecem a colonização secundária por *A. israeli*.

As lesões actinomicóticas cervicofaciais, toracopulmonares e abdominais são quase sempre determinadas por actinomicetos anaeróbios. As lesões são graves, tendendo à disseminação. O agente etiológico é de cultivo difícil, exigindo anaerobiose estrita ou relativa para seu crescimento.

Os conceitos de actinomicose exógena e endógena são, em geral, aceitos na prática médica. No entanto, foram descritos casos com lesões actinomicóticas toracopulmonares típicas de actinomicose endógena, produzida por actinomicetos aeróbios pós-ferimento com material de origem vegetal.

► **Identificação de actinomicetos.** Isolar e caracterizar esses agentes é tarefa para especialistas. Para o isolamento de agentes de actinomicetomas deve-se realizar cultivos em meios aeróbios e anaeróbios, depois de prévia observação dos grãos actinomicóticos.



**Figura 32.39** Agente de micetoma eumicótico, *Pseudallescheria boydii* (400×).

## ► Outras micoses

### ▪ Blastomicose queloidiana (lacaziose)

A blastomicose queloidiana é micose subcutânea causada pelo fungo *Lacazia loboi*. Este fungo nunca foi cultivado, e sua presença já foi verificada no homem e em delfins. As lesões em delfins e a localização no homem em áreas expostas, sujeitas a trauma, sugerem que o agente se encontra em água e vegetações de área úmidas ao redor de regiões lacustres.

Esta é uma doença crônica, caracterizada pela presença de nódulos duros, localizados nos membros superiores e inferiores, na área lombossacral, espaldar, no pavilhão auricular e nariz. As lesões adquirem um aspecto pseudotumoral, recobertas com pele atrófica e aspecto de quelóide, e em algumas ocasiões podem ser verrucosas e ulceradas. A evolução crônica e as lesões podem persistir por anos. Os mecanismos de



disseminação agem por contiguidade, por via linfática e autoinoculação.

A doença é principalmente encontrada na América Latina; no Brasil, notadamente na Região Amazônica, ocorre em homens e mulheres, predominando em adultos, principalmente em agricultores, mineiros, pescadores e caçadores. A doença ocorre em certas populações indígenas de Mato Grosso, no Brasil, e de Casanare, na Colômbia.

O diagnóstico baseia-se no exame direto, já que este organismo nunca foi isolado, de material de biópsia ou de exsudatos de lesões ulceradas. Podem ser preparados com KOH, calcoflúor ou em colorações de HE, PAS ou prata.

Nos raspados, exsudatos e outros são observados, em grande quantidade, blastoconídios ovais ou redondos de 7 a 12 µm de diâmetro, de tamanho uniforme e de parede espessa. Grande número de blastoconídios apresenta-se em cadeias unidas por pontes citoplasmáticas aparentes. A resposta é do tipo granulomatoso, nodular. Estudos de filogenia foram realizados e mostram que *L. loboi* forma um táxon independente de *Paracoccidioides brasiliensis*.

### ▪ Peniciliose (*P. marneffei*)

O *Penicillium marneffei*, fungo filamentoso dimórfico, com hifas hialinas, é agente de uma hialo-hifomicose grave que acomete principalmente pacientes HIV-positivos. A forma disseminada da doença, descrita na Ásia, é a 3ª causa mais frequente na Tailândia para a definição de AIDS, após tuberculose e criptococose. Entre 1987 e junho de 1992, foram notificados 86 casos desta micose associada à infecção pelo vírus HIV. As manifestações clínicas são febre, perda de peso, lesões de pele, anemia e hepatoesplenomegalia. As lesões de pele, nódulos subcutâneos, são em geral necróticas e similares às produzidas por *Molluscum contagiosum*. A importância da doença está não somente na alta letalidade, mas no diagnóstico histológico diferencial de histoplasmoses. O exame direto corado dos tecidos cutâneo, sangue ou medula óssea permite visualizar formas leveduriformes com divisão binária, por fissão da parede extracelular ou intracelular, semelhante à fase L de *H. capsulatum*. A cultura do material biológico em ágar Sabouraud permite o crescimento de cultura filamentosa com tonalidade esverdeada e pigmento solúvel de cor avermelhada característico. A cultura reverte para a fase L à temperatura de 37°C.

Duas séries de nucleotídeos iniciadores podem ser utilizadas em teste PCR *nested*: RRF1-5'ATCTAAATCCCTTAACGAGGAACA3' e RRH15'CCGTCAATTCTTTAAGTTTCAGCCTT 3', ampliando uma sequência de 631 pb do gene 18S rRNA e Pm1 5'ATGGGCCTTTCTTTCTGGG3' e Pm2 5'GCGGGTCATCATAGAAACC3'.

### ▪ Pneumocistose

Esta doença, descrita após a Segunda Grande Guerra, caracterizava-se como pneumonia intersticial, acometendo crianças prematuras ou subnutridas. Na década de 1970, o interesse pela doença ressurgiu quando foram relatados grupos de pacientes com pneumonia associada às imunodeficiências devidas à terapia antineoplásica ou imunossupressora utilizada na prevenção de rejeição a transplantes de órgãos. Com o advento da AIDS, a doença assumiu níveis alarmantes de incidência. A infecção é, atualmente, fator presuntivo de AIDS e é a causa principal de infecção oportunística e mortalidade na síndrome. A doença tem grande importância, por-

tanto, pela alta morbidade e também pela preocupação quanto às medidas de controle devido ao aparecimento de aparente resistência clínica aos tratamentos tradicionais (sulfametoxazol-trimetoprima). As formas clínicas, em pacientes HIV-positivos, assumem caráter diverso do que ocorre em outros grupos. A pneumonia é a forma mais frequente e pode se apresentar de forma aguda, com episódios de recorrência da infecção. A infecção pode se disseminar para o espaço pleural e linfonodos adjacentes ao pulmão. A migração do agente para órgãos vascularizados, pela corrente sanguínea, resulta em infecção renal, hepatoesplênica, gastrointestinal e genit urinária. Manifestações extrapulmonares raras podem ocorrer no coração, nos olhos, ossos e ouvidos.

No final do século 20, *Pneumocystis carinii* foi identificado como um grupo heterogêneo de fungos microscópicos, constituído de várias entidades biológicas largamente difundidas por meio dos ecossistemas estreitamente adaptados e coevoluindo paralelamente com as espécies de mamíferos. Até agora, cinco espécies de *Pneumocystis* foram descritas, principalmente na base do conceito de espécie filogenética: *P. carinii* e *Pneumocystis wakefieldiae* em ratos, *P. jirovecii* em humanos, *Pneumocystis murina* em camundongos e *Pneumocystis oryctolagi* em coelhos. Curiosamente, *Pneumocystis* exibem uma adaptação bem-sucedida que lhes permite viver e reproduzir nos pulmões de mamíferos imunocomprometidos e saudáveis, que podem atuar como reservatórios da infecção. O papel de portadores são na transmissão da doença hoje é reconhecido como um importante fator, e a doença tem emergido como um problema de saúde pública. O agente da infecção, *Pneumocystis jirovecii* (formalmente conhecido como *Pneumocystis carinii*), é um organismo eucarioto, unicelular, com tropismo para epitélio do trato respiratório de mamíferos. Até a década de 1980 era classificado como protozoário e, atualmente, passou a ser considerado fungo após estudos de ultraestrutura e genética.

As características que levaram à sua inclusão no reino Fungi são:

- Formação de corpos intracísticos semelhante à asporogênese de ascomicetos
- Ultraestrutura da parede da forma cística similar à parede da célula fúngica
- Crista lamelar na mitocôndria, diferente da tubular, existente em protozoários
- Alta homologia da região 16S do rRNA com a de fungos ascomicetos
- Homologia do rRNA com a de zigomicetos primitivos
- Semelhança com a proteína EF-3, fator de alongamento descrito somente em fungos
- Presença de duas proteínas, timidilato-sintetase e di-hidrofolatase, ao contrário de uma só enzima bifuncional, como ocorre em protozoários
- Homologia das sequências gênicas que codificam enzimas timidilato-sintetase, di-hidrofolato redutase,  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulinas, além de aminoácidos aromáticos com as existentes em fungos.

Por outro lado, o lipídio ergosterol não é encontrado na membrana de *Pneumocystis jirovecii*, como ocorre na célula fúngica. Isso implica ineficácia de muitas substâncias antifúngicas que têm seu sítio de ação neste e em outros esteróis também ausentes em *P. carinii*, que, por sua vez, produz colesterol abundantemente.

O agente não cresce em meios de cultura clássicos, sendo cultivado somente em cultura de células. Desse modo, o conhecimento sobre morfologia, características moleculares



e ciclo de vida de *P. jirovecii* é limitado e está sob constante alteração. São propostos atualmente dois ciclos de vida, assexual e sexual, para o agente. Apesar de todas as amostras de *Pneumocystis* isoladas de roedores e mamíferos serem aparentemente semelhantes quanto aos aspectos morfológicos, diferentes antígenos e cariótipos indicam diferenças entre as cepas obtidas das duas origens. Roedores podem albergar duas ou mais variedades genéticas de *Pneumocystis*. Esses estudos são valiosos para o desenvolvimento de terapias e testes imunológicos ou genéticos, que podem ser úteis para o controle da infecção.

Não é conhecido o reservatório natural de *P. jirovecii* para a infecção humana. Estudos sorológicos sugerem que ele é onipresente no meio ambiente, com taxas de soroprevalência semelhantes em várias regiões geográficas. A infecção endógena, por reativação de foco infeccioso latente em indivíduos imunodeprimidos, é também uma hipótese aceita.

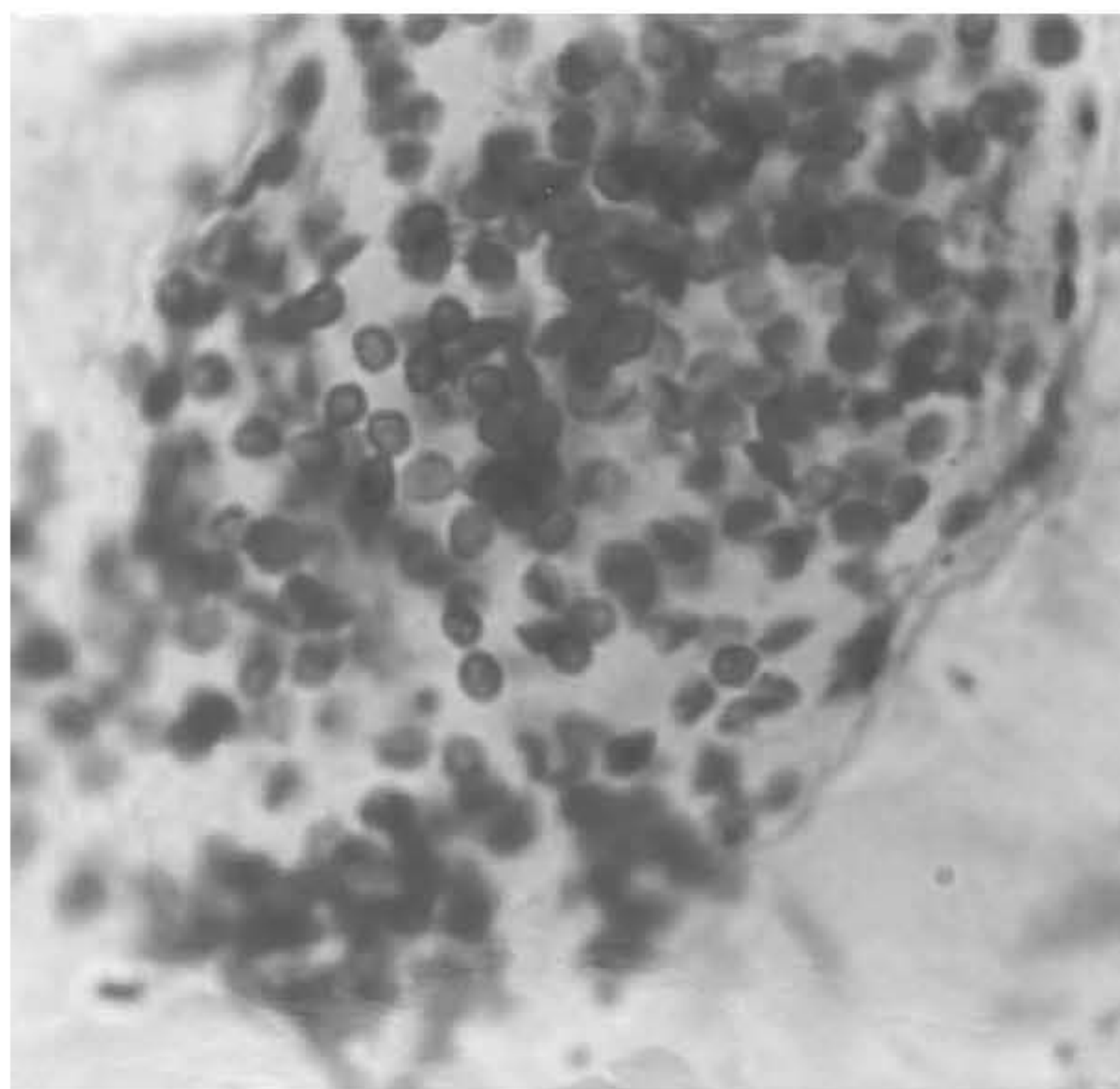
### Identificação

A identificação do agente depende exclusivamente de sua morfologia no tecido ou nos fluidos do hospedeiro. Pode ser visualizado em grande variedade de espécimes do trato respiratório: escarro induzido, aspirado transtraqueal, lavado broncoalveolar, tecido obtido por biópsia transbrônquica ou pulmonar, escovado brônquico, fluido pleural. Para crianças, na impossibilidade de obtenção de escarro, recomenda-se a coleta de secreção por aspiração traqueal ou broncoscopia ou mesmo tecido obtido por biópsia pulmonar.

Em pacientes com AIDS, o diagnóstico pela pesquisa direta do agente no escarro induzido tem sensibilidade de 80%. Em lavado ou aspirado brônquico, essa taxa é mais elevada. Em pacientes com doenças subjacentes ou outros fatores que não AIDS, *P. jirovecii* é raramente observado em escarro induzido, e para o diagnóstico há necessidade de material coletado por broncoscopia ou biópsia. As diferentes cargas parasitárias existentes nos materiais biológicos dos dois grupos de pacientes podem justificar essa conduta. A indução do escarro deve ser realizada, preferencialmente, por técnicos ou fisioterapeutas. É importante a prévia assepsia da cavidade bucal do paciente, somente com escovação rigorosa com solução salina a 0,85%. Pasta dentifrícia pode interferir posteriormente na coloração do material biológico. A secreção mucoide e translúcida, raramente purulenta, é obtida pela expectoração que se segue após a nebulização de solução de cloreto de sódio a 3%. Pode ser usado o teste PCR *nested* com os iniciadores PAZ 102E e pAZ102H, que fornece um fragmento de 340 pb, e os pLE1 (59-TCGGACTAGGATATAGCTGG-39) e pLE2 (59-CCCTTTCGAC TATCTACC-39) para obter um produto final de 193 pb.

### Exame direto

O uso de terapia não interfere no resultado do exame se o espécime clínico for coletado em até 3 dias após seu início. O material biológico deve ser tratado (v/v) com solução mucolítica, por exemplo N-acetilcisteína. Pode ser usada também solução 0,0065 M de ditiotreitol, diluído conforme recomendação do fabricante. A digestão será facilitada se o material for colocado em estufa com agitação à temperatura de 35°C até liquefação semicompleta. A liquefação total dispersa as células de *P. carinii* e dificulta a sua observação microscópica. O material é, então, centrifugado a 1.300 g durante 15 min e do sedimento é realizado esfregaço em lâmina de microscopia. Diversas colorações são utilizadas para a pesquisa do agente. Corantes com afinidade à parede de fungo, como PAS,



**Figura 32.40** Aspectos micromorfológicos de *Pneumocystis jirovecii*, coloração azul de toluidina, 1.000 x.

Gomori, azul de ortotoluidina e calcoflúor, prestam-se muito bem à visualização de formas císticas e permitem, também, a observação do espessamento duplo focal típico da parede de *P. carinii* (*double commas*).

A coloração de Giemsa e outras correlatas coram muito bem as células em estágio não cístico ou trófico, conferindo cor púrpura ao núcleo e tons azuis ao citoplasma. A parede aparece como um halo claro ao redor. O método de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais é largamente utilizado, tanto para a verificação de formas císticas quanto para tróficas.

As células das formas tróficas de *P. jirovecii* podem ser pequenas, com 1,5 a 2 µm, ou grandes, com 3 a 5 µm. O núcleo do trofozoíta mede 0,5 a 1 µm. A fase pré-cística permite a visualização de formas grandes (4 a 5 µm) que evoluem para cisto maduro (5 µm) contendo 8 ou mais corpos intracísticos esféricos, ovais ou fusiformes. Todas essas estruturas recebem nomes consagrados em micologia. Assim, a fase sexuada (ou cística) na esporogênese produz esporocistos (pré-cistos) que resultam em órgãos de reprodução (cistos) ou ascos com esporos (corpos intracísticos) (Figura 32.40).

### ► Bibliografia

- Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;15:40(1):41-9.
- Ahmed AO, Mukhtar MM, Kools-Sijmons M, Fahal AH, De Hoog S, Van Den Ende BG, Zijlstra EE, Verbrugh H, Abugroun ES, Elhassan AM, Van Belkum A. Development of a species-specific PCR-restriction fragment length polymorphism analysis procedure for identification of *Mucor* spp. *J Clin Microbiol*. 1999;37(10):3175-8.
- Ajello L. Hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis: two global disease entities of public health importance. *Eur J Epidemiol*. 1986;2:243-51.
- Ajello L, Hay RJ. Medical mycology. In: Collier L, Balows A, Sussman M (ed.). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9<sup>th</sup> ed. London: Arnold; New York: Oxford University Press, 1998. v. 4.
- Alastruay-Izquierdo A, Hoffmann K, De Hoog GS, Rodriguez-Tudela JL, Voigt K, Bibashi E, Walther G. Species recognition and clinical relevance of the



- zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* pro parte, Mycocladus). J Clin Microbiol. 2010;48(6):2154-70.
- Al-Ddory Y. The epidemiology of human mycotic diseases. Springfield: Charles C. Thomas, 1975.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory Mycology. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- Almeida AMF, Matsumoto MT, Baeza Lilian C, Silva R, Klainer AAP, Melhem MCS, Mendes-Giannini MJS & The Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. FEMS Yeast Research. 2007;7:152-164.
- Alves K de S. Histoplasmose disseminada e síndrome de imunodeficiência adquirida: estudo clínico-laboratorial de 28 casos. (Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina da USP.) São Paulo, 1996.
- Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MG. Emerging fungal pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1989;8:323-31.
- Arango M, Castaneda E. Micosis humanas. Procedimentos diagnósticos. CIB. 1985. 195p.
- Arechavala AI, Robles AM, Megroni R, Bianchi, MH, Taborda, A. Valor de los metodos directos e indirectos de diagnostico en las micosis sistemicas asociadas al SIDA. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1993;35(2):163-9.
- Ashbee HR, Ingham EI, Holland KI, Cunliffe WJ. The carriage of *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis and controls. Br J Dermatol. 1993;129:533-40.
- Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol. 1998;37:682-6.
- Bambirra EA, Miranda D, Nogueira AMMF, Barbosa CSP. Phaeohyphomycotic cyst; a clinicopathologic study of the first four cases described from Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1983;32:794-8.
- Barbas Filho JV et al. Respiratory failure caused by adiaspiromycosis. Chest. 1990;97:1171-5.
- Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3457-9.
- Benard G, Mendes-Giannini MJS. Textbook of Pediatric Infections Diseases. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL. (Eds.). Paracoccidioidomycosis. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2009. v. 2, p. 2762-2776.
- Beneke ES, Rogers AL. Medical mycology and human mycoses. Belmont, California: Star Publishing Co., 1995.
- Bennett JW. *Aspergillus*: a primer for the novice. Med Mycol. 2009;47:S5-S12.
- Bergan T, Hollun AB, Vangdal M. Evaluation of four commercial biochemical test systems for identification of yeasts. Eur J Clin Microbiol. 1982;1:217-22.
- Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Ceceñas L, Reischl U, González GM. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. J Clin Microbiol. 2004;42(2):778-83.
- Bille J, Stockman L, Roberts CD, Horstmeler CD, Ilstrup DM. Evaluation of a lysis-centrifugation system for recovery of yeast and filamentous fungi from blood. J Clin Microbiol. 1983;18:469-71.
- Bittencourt AL. Entomofatoromicose. Revisão. Med Cut I La. 1998;16:93-100.
- Bodey GP, Vartivarian S. Aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1989;8:413-37, 1989.
- Booth C. *Fusarium*: Laboratory Guide to the identification of the major species. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1977.
- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace Jr. RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev. 2006;19(2):259-82.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993;6:89-117.
- Bueno JP, Mendes-Giannini MJS et al. IgG, IgM and IgA antibody response (ELISA and indirect immunofluorescence) for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison with counter immunoelectrophoresis and complement fixation. J Med Vet Mycol. 1997;35:213-7.
- Burns R, Roy JS, Woods C, Padhye A, Warnock DW. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. J Clin Microbiol. 2000;38:1283-5.
- Camargo ZP, Unterkircher C et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol. 1988;26:2147-51.
- Campbell CK, Davey KG, Holmes AD, Szekely A, Warnock DW. Comparison of the API Candida System with the Auxacolor System for the identification of common yeast pathogens. J Clin Microbiol. 1999;35:821-3.
- Candido RC. *Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos. (Tese de Doutorado – Escola Paulista de Medicina.) São Paulo, 1991.
- Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. Expert Rev Anti Infect Ther. 2009;7(1):107-119.
- Caramalac DA. Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidos. Tipagem de amostras de *Candida albicans*. (Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da USP.) São Paulo, 1995.
- Cejudo MT, Gallego AG, Lacasa EC, Aller AI, Romero A, Garcia JP, Andrés GQ, Martín-Mazuelos E. Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, flucytosine, fluconazole and voriconazole: a comparison with the M27-A3 reference method. Med Mycol. 2010;29 (printing).
- Chabé M, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Aliouat EM, Viscogliosi E, Dei-Cas E. Pneumocystis: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. FEMS Yeast Res. 2011;11(1):2-17. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00698.x. Epub 2010 Nov 26.
- Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. A Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases. London: Wolfe Medical Publications, 1980.
- Chang HJ, Miller MD, Watkins N et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care worker's pet dogs. N Engl J Med. 1998;338:706-11.
- Clinical Laboratory Standard Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, USA, 2009.
- Clinical Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. Document M27-A3. Wayne, Pa, USA, 2008.
- Clinical Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Informational supplement M27-S3. Wayne, Pa, 2008.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa, USA, 2008.
- CLSI Clinical And Laboratory Standard Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Proposed Guideline. CLSI document M51-P. Wayne, USA, 2009.
- CLSI Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Informational Supplement. CLSI document M51-S1 (Proposed). Wayne, USA, 2009.
- CLSI Clinical and Laboratory Standard Institute. Zone Diameter Interpretative Standards, Corresponding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretative Breakpoints, and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational Supplement. CLSI document M44-S3. Wayne, USA, 2009b.
- Cooke WB. *The Ecology of Fungi*. Florida: CRC Press, 1979.
- Cornacchioni ABL, Furrer AMA, Renesto PG, Costa ABG, Cristófani LM, Brito JLBC, Aquino MZ, Odone Filho V, Heins-Vaccari EM, Lacaz CS, Martins MA. Fungemia por *Malassezia furfur* em criança imunodeprimida. Arq Bras Med. 1996;70:91-3.
- Costa AR, Pires MC, Porto E, Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Maranhão WM. Interdigital, cutaneous phaeohyphomycosis due to *Scytalidium lignicola*. Pesante 1957. A case report. Mycoses. 1988;12:604-12.
- Coutinho, S. Dall'Acqua. *Malassezia pachydermatis*. Caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e ducto auditivo externo de cães. (Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Área de atuação: Microbiologia). São Paulo, 1997.
- Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect. 2003;9(6):467-74.
- Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(3):267-276.
- De Andrade TS, Cury AE, De Castro LG, Hirata MH, Hirata RD. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(3):267-72.
- De Repentigny L, Kaufman L et al. Immunodiagnosis of invasive fungal infections. J Med Vet Mycol. 1994;32 (suppl 1):239-52.
- Deacon JW. *Modern Mycology*. 3<sup>rd</sup> ed., Oxford, Blackwell Science Ltd., 1997.
- DeCock AWAM, Mendoz L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. J Clin Microbiol. 1987;25:344-9.



- Del Negro G, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Vidal M, Carbel G, Benard G. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2000;49:37-46.
- Delacrétaz J, Grigoriu D, Duce G. Atlas de Micologia Médica. São Paulo: Manole, 1977.
- Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3269-76.
- Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemma ME, Coles FB. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporothichosis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1106-13.
- Dixon DM, Walsh TJ, Merz WG, McGinnis MR. Infection due to *Xylohypha bantiana* (*Cladosporium trichoides*). *Res Inf Dis.* 1989;11:515-25.
- Duong TA. Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin Inf Dis.* 1996;23:125-30.
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature.* 1988;334:519-22.
- Ellis DH. Clinical Mycology: The Human Opportunistic Mycoses. New York: Pfizer, 1994.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1642-4.
- Eng RHK, Drehmel R, Smith SM, Goldstein EJ. *Saccharomyces cerevisiae* infection in man. *J Med Vet Mycol.* 1984;22:403-7.
- Eraso E, Moragues MD, Vidal MV, Sahand IH, Gomez NG, Ponto J, Quindo G. Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3340-5.
- Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1811-20.
- Espinel-Ingroff A, Canton E. Comparison of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1793-803.
- Espinel-Ingroff A, Oakley LA, Kerker TM. Opportunistic zygomycotic infections. *Mycopathologia.* 1987;97:33-41.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME, Jones RN. Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. *J Clin Microbiol.* 1996;34:848-52.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):718-21.
- Fader RC, MacGinnis MR. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Infect Dis Clin North Amer.* 1988;2:925-38.
- Fidalgo O, Fidalgo MEPC. Dicionário Micológico. Instituto de Botânica. Sec. Agricultura do Estado de São Paulo, Brasil. Rickia. 1967; 232p.
- Fischer JB, Kane J. The laboratory diagnosis of dermatophytosis complicated with *Candida albicans*. *Can J Microbiol.* 1974;20:167-82.
- Fisher JF, Clew WH, Shadomy S, Duma RJ, Mayhall CGHWC. Urinary tract infections due to *Candida albicans*. *Rev Infect Dis.* 1982;4:1107-18.
- Fisher JF, Newman CL, Sobel JD. Yeast in the urine: solutions for a budding problem. *Clin Infect Dis.* 1995; 20:183-9.
- Fletcher HA, Barton RC, Verweij PE, Evans EG. Detection of *Aspergillus fumigatus* PCR products by a microtitre plate based DNA hybridization assay. *J Clin Pathol.* 1998; 51:617-20.
- Fox JL. Fungal infection rates are increasing. *ASM News.* 1993;59:515-8.
- Franco M, Lacaz CS, Restrepo Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- Frey D, Oldfield RJ, Bridger RC. A Colour Atlas of Pathogenic Fungi. London: Wolfe Medical Publications, 1985.
- Fridkin SK, Padhye AA, Kremer F, Bland L, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:499-511.
- Friker-Hidalgo H, Lebeau B, Kervroedan P, Faure O, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Auxacolor a new commercial system for yeast identification: evaluation of 182 strains comparatively with ID 32C. *Ann Bio Clin.* 1995;53:221-5.
- Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol.* 1995;33:962-9.
- Fusco-Almeida AM. Análise do cariótipo eletroforético de diferentes amostras de *Cryptococcus neoformans* e correlação com suscetibilidade a drogas antifúngicas. Dissertação de Mestrado, apresentada ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Araraquara, 2000.
- Gandra RF, Simão RC, Matsumoto FE, Silva BC, Ruiz LS, Silva EG, Gambale W, Paula CR. Genotyping by PAPD – PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis patients. *Mycopathologia.* 2006;162(4):273-80.
- García-Martos P, Mira-Gutiérrez J. *Trichosporon* y *Trichosporonosis*: A propósito de 13 casos. *Rev Iberoamer Micol.* 1995;12:111-3.
- García-Ruiz JC, Arilla MC et al. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with haematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3284-7.
- Ghannoum MA, Rex JH, Galgiani. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. *J Clin Microbiol.* 1996;34:489-95.
- Gökahmetoğlu S, Nedret Koç A, Güneş T, Cetin N. Case reports. *Trichosporon mucoides* infection in three premature newborns. *Mycoses.* 2002;45:123-5.
- Goldani LZ, Craven DE, Sugar AM. Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. *J Med Vet Mycol.* 1995;33:267-70.
- Gómez BL, Figueroa JL et al. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2618-22.
- Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Anjos MM, Melhem MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):727-30.
- Gottfredson M, Cox GM, Perfect JR. Molecular methods for epidemiology and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology.* 1998;30:405-18.
- Graybill JR. Histoplasmosis and AIDS. *J Infect Dis.* 1988;158:623-6.
- Greer DL. Basidiomycetes as agents of human infections: a review. *Mycopathologia.* 1977;65:133-9.
- Guého E et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human stain and as pathogens. *Medical Mycology.* 1998;36(supp. 1):220-9.
- Guého E, Faergeman J, Lyman C, Anaissie EJ. *Malassezia* and *Trichosporon*: two emerging pathogenic basidiomycetous yeast-like fungi. *J Med Vet Mycol.* 1994;32 (supp 1):367-78.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Leeuwenhoek.* 1996;69:337-55.
- Gugnani HC, Oyeka CA. Foot infections due to *Hendersonula toruloidea* and *Scytalidium hyalinum* in a coal miners. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:169-79.
- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med.* 1996;6:103-10.
- Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Guého E. A single PCR- restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Appl Microbiol.* 2000;31:400-3.
- Guinet RMF. Evaluation of the new Mycotube test-kit for yeast identification. *Eur J Clin Microbiol.* 1985;4:10-13.
- Gupta A, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4253-60.
- Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Kumar L, Samantaray JC, Agarwal SK, Kabra SK, Luthra K. Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(4):381-8.
- Haase G. *Pneumocystis carinii* Delanoe & Delanoe (1912) has been placed in the Archiascomycetales, a class of Ascomycota. *Infect Immun.* 1997;65:4365-6.
- Hageage GJ, Harrington BJ. Use of calcofluor white in clinical mycology. *Lab Med.* 1984;15:109-12.
- Hajjeh RA, Brandt ME, Pinner RW. Emergence of cryptococcal disease: epidemiology perspectives 100 years after its discovery. *Epidemiol Rev.* 1995;17:303-20.
- Hamdan JS, Resende MA, Franzot SP, Dias DV, Viana EM, Casali AK. A case of mycotic keratitis caused by *Fusarium solani*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1995;37:181-3.
- Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffei: current status and future trends. *Med Mycol.* 1998;36:351-54.
- Hanazawa R, Murayama SY, Yamaguchi H. In situ detection of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 2000;49:285-90.
- Hantschke D. Differentiation of yeast-like fungi using the commercial Auxacolor system. *Mycoses.* 1996;39:135-40.



- Harini AR, Hempel HO, Kimberlin CL, Goodman NL. Effects of time lapse between sputum collection and culturing on isolation of clinically significant fungi. *J Clin Microbiol*. 1982;15:425-8.
- Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermat*. 2010;28:190-6.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:462-78.
- Head ES, Henry JC, MacDonald EM. The cotton swab: technic for culture of dermatophyte infections: its efficacy and merit. *J Am Acad Dermatol*. 1984;11:797-801.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:469-88.
- Hoog GS, Guarro J (eds.). *Atlas of Clinical Fungi*. The Netherlands, Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Deftt, 1995.
- Hoog GSDE, Guého E, Masclaux F, Gerrits Van Den Ende AHG, Kwon-Chung KJ, McGinnis MR. Nutritional physiology and taxonomy of human-pathogenic *Cladosporium-Xylohypha* species. *J Med Vet Mycol*. 1995;33:339-47.
- Hopkin JM. *Pneumocystis carinii*. Oxford: Oxford University Press, 1991.
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009;48(12):1695-703.
- Hunter PR. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Crit Rev Microbiol*. 1991;17:417-34.
- Huppert M, Harper G, Sung HS, Delanerolle V. Rapid methods for identification of yeasts. *J Clin Microbiol*. 1975;11:541-2.
- Ilkit M. Favus of the scalp: an overview and update. *Mycopathologia*. 2010;170(3):143-54.
- Januario C, Maffei CML, Martinez R. Performance do sistema MicroScan para identificação de leveduras isoladas de pacientes. *Rev Bras Soc Med Trop*. 1999;32(1):197.
- Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Odenholt I. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(6):501-3.
- Kamei K, Unno H, Nagao K, Kuriyama T, Nishimura K, Miyaji M. Allergic bronchopulmonary mycosis caused by the basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*. *Clin Inf Dis*. 1994;18:305-9.
- Kaufman L. Immunohistologic diagnosis of systemic mycosis: an update. *Eur J Epidemiol*. 1992;8:377-82.
- Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. In: Rose NR, DeMacario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM (eds.). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985, p. 506-26.
- Kaufman L, Standard PG. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Ann Rev Microbiol*. 1987;41:209-25.
- Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirata Y, Tomono K, Tashiro T, Hohno S. Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 1999;37:218-20.
- Kern ME, Blevins K. *Medical Mycology. A Self-Instructional Text*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1997.
- Kicht TT, Jacobs MR, McGinnis MR, Apelbaum PC. Ability of rapid yeasts plus system to identify 304 clinically significant yeasts within 5 hours. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1069-71.
- Klein AS, Tortoga GT, Malowitz R, Greene NH. *Hansenula anomala*: a new fungal pathogen. *Arc Intern Med*. 1988;148:1210-3.
- Kobayashi M, Sonobe H, Ikezoe T, Hakoda E, Ohtsuki Y, Taguchi, H. In situ detection of *Aspergillus* 18S ribosomal RNA in invasive pulmonary aspergillosis. *Intern Med*. 1999;38:563-9.
- Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Dec;7(10):1201-21.
- Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4<sup>th</sup> ed. Netherlands: Elsevier Science, B.V., 1998.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
- Lacaz CS (Coord.). *Infecções por agentes oportunistas*. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1997.
- Lacaz CS. Rinosporidiose. *Rev Iber Micol*. 1996;551-5.
- Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Melo NT, Moreno-Carvalho OA, Sampaio MLS, Nogueira LS, Badaró RJS, Livramento JA. Neurocriptococose por *Cryptococcus neoformans* não capsulado. *Arq Neuropsiquiatr*. 1993;51:395-8.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica. Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico*. 8<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Guia Para Identificação: Fungos, Actinomicetos, Algas de Interesse Médico*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier, 1998.
- Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. Evaluation of the new API 20C strip for yeasts identification against a conventional method. *J Clin Microbiol*. 1979;10:357-64.
- Landlinger C, Preuner S, Willinger B, Haberpursch B, Racil Z, Mayer J, Lion T. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1063-73.
- Latge JP. Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*. *Curr Top Med Mycol*. 1995;6:245-81.
- Law D, Moore CB, Denning DW. Amphotericin B resistance testing of *Candida* spp. – a comparison of methods. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40:109-12.
- Lazéra MS, Wanke B et al. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Vet Mycol*. 1993;31:449-54.
- Lerner PL. Nocardiosis. *Clin Inf Dis*. 1996;22:891-905.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Br J Dermatol*. 1997;137:351-5.
- Liu D, Coloe S, Pedersen J, Baird R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiol Lett*. 1996;136:147-50.
- Lopes JO, Alves SH, Benevenga JP, Salla A, Khomohan C, Silva CB. Subcutaneous pseudallescheriasis in renal transplant recipient. *Mycopathologia*. 1994;25:153-6.
- Lopes JO, Pereira DV, Steher LA et al. Cutaneous zygomycosis caused by *Absidia corymbifera* in a leukemic patient. *Mycopathologia*. 1995;130:89-92.
- Lopes JO, Torres-Rodriguez JM. Espécies fúngicas pouco comuns responsáveis de oncomicoses. *Rev Iberoameric Micol*. 1999;16:S11-5.
- Louie T, El Baba F, Shulman M, Jimenez-Lucho V. Endogenous endophthalmitis due to *Fusarium*. Case report and review. *Clin Inf Dis*. 1994;18:585-8.
- MacNeil MM, Brown JM. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7:357-417.
- Maffei CML, Paulas CR, Mazzocato TS, Franceschini S. Phenotype and genotype of *Candida albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis. *Mycopathologia*. 1997;137:87-94.
- Mallié M, Montes B, Lebecq JC, Bastide JM. Etude du profil enzymatique de quelques espèces de levures. *Bull Soc Fr Mycol Med*. 1989;18:103-8.
- Marcon MJ, Powell DA. Human infections due to *Malassezia* ssp. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5:101-19.
- Marimon R, Cano J, Gene J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3198-3206.
- Martins MA, Araújo EMPA, Kuwakino MH, Heins-Vaccari EM, Del Negro GMB, Voza Junior JA, Lacaz CS. Coccidioidomycosis in Brazil. A case report. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1997;39:299-304.
- Matsumoto T, Ajello L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. *Int J Dermatol*. 1987;26:491-99.
- Matta VLR, Melhem MSC, Colombo AL, Moretti ML, Roderio L, Almeida GMD, Martins MA, Dias BS, Nucci M, Levin ASC. Susceptibility profile to antifungal drugs of *Pichia anomala* isolated from patients presenting nosocomial fungemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1573-1576.
- Matthews RC. Comparative assessment of the detection of candidal antigen as a diagnostic tool. *J Med Vet Mycol*. 1996;34:1-10.
- McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8:1-16.
- McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York: Academic Press Inc., 1980.
- McGinnis MR, Molina TC, Pierson DL, Mishra SK. Evaluation of the Biolog Microstation System for yeasts identification. *J Med Vet*. 1996;34:349-52.
- McGinnis MR, Severo LC, Kalil R, Falleiro PT. Endocarditis caused by *Fusarium pallidroseum*. *J Mycol Med*. 1994;4:45-7.
- Melhem MSC. Biótipos, cariótipos e perfis de suscetibilidade a antifúngicos de amostras seriadas de *Candida albicans* de pacientes com candidíase bucal associada à síndrome da imunodeficiência adquirida. (Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.) São Paulo, 1997.
- Melhem MSC, Talarico C, Pappalardo MCS, Maria A, Matsubara R. Perfil de suscetibilidade de *C. albicans* causadoras de candidíase vaginal. Anais do Congresso Brasileiro de Infectologia, Palácio das Convenções Anhembi, São Paulo, 1999.
- Melo NT, Lacaz CS, Charbel CE, Pereira AD, Heins-Vaccari EM, França-Netto AS, Machado LR, Livramento JA. Quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de C.G.B. no estudo daquela levedura. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993;35:465-78.
- Mendes-Giannini MJS. Anticorpos Monoclonais em Micologia Médica. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. (Orgs.).



- Tratado de Micologia Médica – Lacaz. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 850-854.
- Mendes-Giannini MJS, Benard G. Paracoccidioidomycosis. In: Ausina VR, Guillén SM (Orgs.). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1 ed. Madrid: Médica Panamericana, 2005;1:675-680.
- Mendes-Giannini MJS, Bueno JP *et al.* Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43:200-6.
- Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (Eds.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 345-63.
- Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med.* 1996;6:151-64.
- Merz WG, Connely C, Hieyer P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1988;26:842-5.
- Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods.* 2005;61:281-84.
- Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *Journal of Medical Microbiology.* 2010;59:414-20.
- Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *J Med Vet Mycol.* 1994;32:351-66.
- Musial CA, Cokerill III FR, Roberts GD. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev.* 1988;1:349-64.
- Nan Scott E, Muchmore HG, Felton FG. Comparison of enzyme immunoassay and latex agglutination methods for detection of *Cryptococcus neoformans* antigen. *Am J Clin Pathol.* 1980;3(6):790-4.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antifungal Susceptibility Testing Committee Report NCCLS document M20-CR. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1985.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. M27-P. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline. Approved guideline M23-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1994.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed Standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1992.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative Standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1995.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pennsylvania, 1997.
- Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1981.
- Neueglise C, Sarfati J, Latge J, Paris S. Afut1, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. *Nucl Acids Res.* 1996;24:1428-1434.
- Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Bailliere Tindall, 1988.
- Odds FC, Rinaldi MG, Cooper Jr. CR, Fothergill A, Pasarell L, McGinnis MR. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol.* 1997;35:313-6.
- Odds FC, Vranckx L, Woestenborghs F. Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2051-60.
- Palmer DF, Kaufman L, Kaplan W, Cavallaro JJ. *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. Springfield: Charles C. Thomas, 1977.
- Panagopoulou P, Evdoridou J, Bibashi E, Filioti J, Sofianou D, Kremenopoulos G. *Trichosporon asahii*: an unusual cause of invasive infection in neonates. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21:169-70.
- Pappalardo MCSM, Szesz MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, Baez AA, Melhem MSC. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:146-51.
- Paris S, Latge JP. Afut2, a new family of degenerate gypsy-like retrotransposon from *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2001;39:195-8.
- Paugam A, Benchetrit M, Fiacre A, Tourte-Shaefer C, Dupouy-Camet J. Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeasts identification by colour-producing reactions. *Med Mycology.* 1999;37:11-7.
- Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Lüttchen R, Haase G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. *J Clin Microbiol.* 1999;37:202-5.
- Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(4):452-60.
- Perlin DS. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22(6):568-73.
- Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, Rinaldi MG. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for *in vitro* susceptibility testing of isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1650-3.
- Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, Rinaldi MG, Cooper CR, McGinnis MR. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth microdilution testing of amphotericin B, fluconazole and flucytosine. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1104-7.
- Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wengel RP and the SCOPE participant group. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;30:121-9.
- Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1094-7.
- Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4387-9.
- Pfaller MA, Preston T, Bale M, Koantz FP, Body BA. Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and Auto Microb Systems for: identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2054-8.
- Phamer MA. Laboratory AIDS in the diagnosis of invasive candidiasis. *Mycopathologia.* 1992;120:65-72.
- Pincus DH, Orena S, Chatellier S. Yeast identification – past, present, and future methods. *Med Mycol.* 2007;45:97-121.
- Pizzini CV, Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a Western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:20-3.
- Porto E, Cucê LC, Lacaz CS, Salebian A, Morais MM. Feo-hifomicose por *Cladosporium bantianum* (*Xylohypha bantiana*). Registro de um caso em transplantado renal. *An Bras Dermatol.* 1987;62:173-9.
- Queiroz Telles Filho F, Coelho A, Porto E, Lameira RF, Freitas MM, Barbosa J, Ramos LZ. Subcutaneous mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae* probable nosocomial acquired infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1985;27:201-6.
- Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol.* 2009;47(1):3-15.
- Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol.* 2011;49(3):225-36.
- Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori PL, Cappuccinelli P, Aceti A. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus* in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3438-40.
- Reiss E, Tanaka K, Bruber G. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol.* 1998;36:249-57, 1998.
- Repentigny LD, Kaufman L, Cole GT, Kruse D, Latgé JP, Matthews RC. Immunodiagnosis of invasive fungal infection. *J Med Vet Mycol.* 1994;32 (suppl 1): 239-52, 1994.
- Rippon JW. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988.
- Roberts GD, Pfaller M, Gueho E, Rogers TR, De Vroey C, Merz, WG. Development in the diagnostic mycology laboratory. *J Med Vet Mycol.* 1992;30:241-8.
- Rocha MM. Histoplasmosse disseminada em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Estudo de 25 casos. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.) Porto Alegre, 1992.
- Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2468-72.



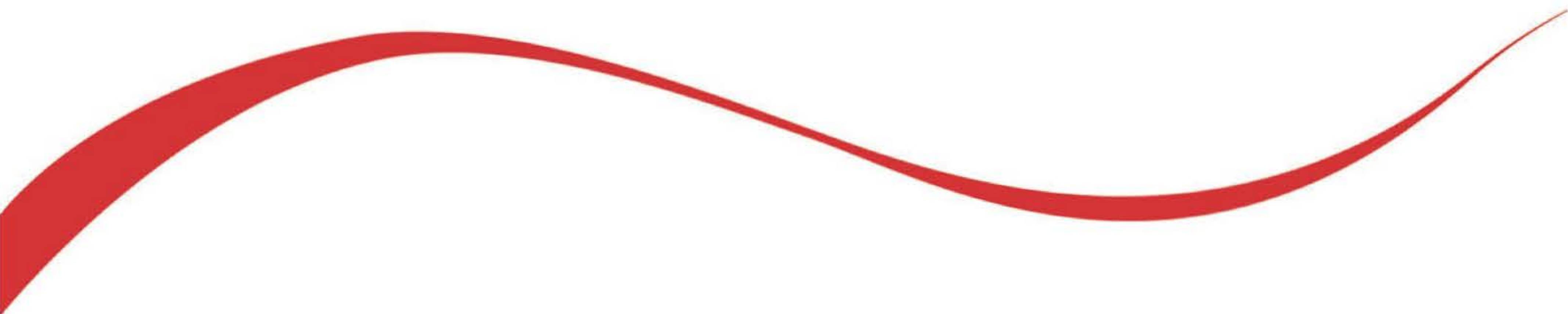
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(4):398-405.
- Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J. EUCAST Technical Note on fluconazole. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(2):193-195.
- Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J. EUCAST Technical Note on voriconazole – Subcommittee on antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID European committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(10):985-987.
- Rodriguez-Tudela JL, Martinez Suarez JV, Dronda F, Laguna F, Chaves F, Valencia E. Correlation of *in vitro* susceptibility test results with clinical response: a study of azole therapy in AIDS patients. *J Antimicrob Chemother*. 1995;35:793-804.
- Rodriguez-Tudela JL, Rodero L, Córdoba S, Estrella MC. Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio. Manual do II Curso Hispano-Argentino de Micología Médica [material impresso]. Buenos Aires, 1998.
- Roy B, Meyer BA. Confirmation of the distinct genotype group with the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36:216-8, 1998.
- Sabbaga E, Tedesco-Marchesi LM, Lacaz C da S, Cucé LC, Salebian A *et al*. Feohifomicose subcutânea por *Exophiala jeanselmei*. Registro de três casos em transplantados renais. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1994;36:175-83.
- Salfelder K *et al*. Atlas of Fungal Pathology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990.
- Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes-Giannini MJS. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1723-8.
- Salkin IF, McGinnis MR, Cooper CR, Rippon JW, Beneke ES. Current priorities for the clinical Mycology laboratory. *J Med Vet Mycol*. 1994;32:309-19.
- Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, Lacaz C da S. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2913-9.
- Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, Lacaz C. da S. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1894-6.
- Schuffenecker I, Freydière A, De Montelos H, Gille Y. Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12:255-60.
- Sendial B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulani D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1510-7.
- Severo LC, Bassanesi MC, Londero AT. Tinea nigra: report of four cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil) and a review of Brazilian literature. *Mycopathologia*. 1994;126:157-62.
- Sheppard DC, Souza E, Hashmi Z, Robson HG, René P. Evaluation of the Auxa-color system for biochemical identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3726-7.
- Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol*. 1999;37:165-70.
- Silva Vargas VE. Estudo imunomolecular de *Malassezia furfur* RAPD e avaliação da resposta humoral de pacientes com dermatite seborreica e piritíase versicolor. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo.) São Paulo, 1997.
- Singer-Vermees LM, Burger E, Franco MF, Di Bacchi MM, Mendes-Giannini MJS, Calich VL. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol*. 1989;27:71-82.
- Smilack JD. Zoonotic transmission of sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 1993;17:1075-6.
- Soares CMA, Madlein ME, Silva SP, Pereira M, Felipe MSS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:505-7.
- Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly?. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:489-98.
- Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T. Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1458-60.
- Sugita T, Tagima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol*. 2004;48:579-83.
- Sugita Y, Kanaizuka I, Nakajima H, Ibe M, Yokota S, Matsuyama S. Detection of *Candida albicans* DNA in cerebrospinal fluid. *J Med Vet Mycol*. 1993;31:353-8.
- Taborda PR, Taborda VA, McGinnis MR. *Lacazia loboi* gene. nov. and comb. nov, the etiologic agent of lobomycosis. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2031-53.
- Telenti A, Roberts GD. Fungal blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8:825-31.
- Telles Filho FQ. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. (Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.) Porto Alegre, 1996.
- Téllez-Castillo CJ, Gil-Fortuño M, Centelles-Sales I, Sabater-Vidal S, Pardo Serrano F. Infección fatal por *Trichosporon asahii* en una recién nacida de pretérmino. *Rev Chil Infect*. 2008;25:213-5.
- Torres-Rodriguez JM. Nuevos hongos patógenos oportunistas emergentes. *Rev Iberoamer Micol*. 1996;13:530-8.
- Vanittanakom N, Vanittanakom P, Hay RJ. Rapid identification of *Penicillium marneffe* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *J Clin Microbiol*. 2002;40(5):1739-42.
- Verweij PE, Erjavec Z, Sluiter W. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra and interlaboratory reproducibility. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1612-6.
- Verweij PE, Latge JP. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3150-3.
- Verweij PE, Poulein D, Obayashi T, Patterson TF, Denning DW, Ponton J. Current trends in the detection of antigenemia, metabolites and cell wall markers for the diagnosis and therapeutic monitoring of fungal infections. *Med Mycol*. 1998;36(suppl 1):146-55.
- Wanke B. Coccidioidomycose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994;27 (suppl IV):375-8.
- Warnock DW, Richardson MD. Fungal Infection in the Compromised Patient. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1991.
- Warren NC, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Manual of Clinical Microbiology. 5<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, 1994.
- Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:240-59.
- Wheat LJ. Diagnosis and management of histoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8:480-90.
- Wheat LJ. Diagnosis of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome by detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:1421-4.
- Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral E. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med*. 1981;325:1274-7.
- Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H, Nasu M. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3619-23.
- Yildiran A, Kucüköyük S, Saniç A, Belet N, Güvenll A. Disseminated *Trichosporon asahii* infection in a preterm. *Am J Perinatol*. 2003;20:269-71.
- Zaitz C. Atlas de Micologia: Diagnóstico Laboratorial das Micoses Superficiais e Profundas. Rio de Janeiro: MEDSI, 1995.
- Zaitz C, Campbell I, Marques SA, Luiz LRB, Souza VM de. Compêndio de Micologia Médica. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 1998.
- Zancopé-Oliveira R, Reiss E *et al*. Molecular cloning, characterization and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1999;67:1947-53.
- Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. Distribuição das fontes de infecção do *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em Rio da Preta – Município do Rio de Janeiro (RJ). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1987;29:243-50.







## Seção 7 | Alergias





■ Capítulo 33 | Doenças Alérgicas, 449



## Capítulo 33

---

# Doenças Alérgicas

*Ana Karolina Barreto de Oliveira,  
Maíra Pedreschi e  
Cristina Maria Kokron*

- Introdução, 450
- Diagnóstico das alergias, 450
- Bibliografia, 457



## ► Introdução

A incidência de doenças alérgicas tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, atingindo cerca de 30% da população mundial. Esse dado justifica o grande interesse que o público em geral e a comunidade médica têm em relação ao diagnóstico e tratamento dessas enfermidades. Alergia pode ser definida como uma reação de hipersensibilidade causada por mecanismos imunológicos, mediada por anticorpos ou células. A maior parte das alergias por antígenos ambientais, alimentos e medicações clinicamente significantes são causadas por processos inflamatórios envolvendo a imunoglobulina E – IgE (alergias mediadas por IgE, hipersensibilidade tipo I). Entretanto, podem ser desencadeados por qualquer um dos mecanismos imunológicos descritos por Gel e Coombs em 1963: *hipersensibilidade tipo I* é a clássica, mediada por anticorpos do tipo IgE; *hipersensibilidade tipo II*, reação citotóxica; *hipersensibilidade tipo III*, determinada por imunocomplexos; e *hipersensibilidade tipo IV*, reação do tipo celular.

O termo “alergia” foi primeiramente utilizado por Von Pirquet para descrever uma reação estranha não relacionada com os sintomas da doença que alguns pacientes portadores de difteria apresentavam ao receberem a antitoxina derivada de soro de cavalos. A IgE foi descrita por dois grupos independentes em 1967: o grupo do Ishizaka e de Bennich e Johansson. O primeiro relatou um antissoro que interferia com a atividade reagínica, o qual denominaram de  $\gamma$ E-globulina, mas não conseguiram purificá-lo. O segundo grupo, em 1965, havia descoberto uma nova classe de imunoglobulinas, a qual denominaram IgND e que tinha propriedades reagínicas. Em 1968, os grupos se reuniram e concordaram que as duas proteínas eram a mesma e denominaram-na IgE. A palavra alergia é muitas vezes utilizada erroneamente, confundindo pacientes e médicos, como por exemplo, em situações de intolerância alimentar ou a medicamentos.

O algoritmo de diagnóstico para as doenças alérgicas tem início com história clínica e exame físico detalhados. Enquanto a causa dos sintomas alérgicos pode ser óbvia quando estes aparecem minutos após a exposição a um alérgeno, frequentemente mais de um alérgeno pode ser suspeito pelas circunstâncias. Ao se estabelecer uma associação temporal entre história médica, familiar e ambiental com a exposição alérgica e sintomas alérgicos, pode-se suspeitar ou confirmar a doença alérgica, dependendo da força e consistência dos achados. Entretanto, na maioria das vezes, a confirmação do diagnóstico dependerá de testes *in vivo* ou *in vitro* para verificar o desencadeamento da reação de hipersensibilidade específica pelo paciente.

Existe um grande número de métodos que podem ser utilizados no diagnóstico das reações de hipersensibilidade. Dentre os testes *in vivo* mais utilizados temos os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata ou tardia, de contato, do autossoro e os de provocação. Dentre os testes *in vitro* destacam-se dosagem de IgE total e específica, dosagem de mediadores como histamina e ECP (do inglês *eosinophil cationic protein*), expressão de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo, testes de linfoproliferação com alérgenos, *immunoblot* para detecção de novos alérgenos. A escolha do tipo de teste e também dos alérgenos a serem utilizados vai depender da história e do quadro clínico do paciente.

Em 1988, a Academia Americana de Alergia publicou, após consenso entre especialistas, os “parâmetros práticos” para o diagnóstico e tratamento da asma. Uma das principais con-

clusões deste *workshop* foi a necessidade de reavaliação periódica dos métodos diagnósticos em alergia devido à rapidez da transferência de tecnologia para a prática clínica.

É importante ressaltar que os métodos de escolha para a aproximação diagnóstica de determinado paciente dependem da manifestação clínica e do tipo de reação de hipersensibilidade que pode ter causado aquela manifestação, não havendo um algoritmo único.

## ► Diagnóstico das alergias

### ▪ Testes in vivo

#### *Testes cutâneos de leitura imediata | Puntura (prick test)*

O teste cutâneo de leitura imediata é considerado o principal método para confirmar sensibilização alérgica mediada por IgE. É um procedimento pouco invasivo e, quando realizado corretamente, permite boa reprodutibilidade.

Testes cutâneos são usados para confirmar a sensibilização clínica induzida por grande variedade de alérgenos encontrados naturalmente no ambiente, como os aeroalérgenos (ácaros da poeira domiciliar, polens, alérgenos de animais, fungos e baratas) e alimentos.

Um pré-requisito importante para a realização de testes cutâneos com resultados confiáveis é a disponibilidade de preparações alérgicas estáveis e padronizadas. Potência, estabilidade e concentração conhecidas são características fundamentais para o extrato ser padronizado. A qualidade e a quantificação dos alérgenos presentes nos extratos é muito importante para a interpretação e valorização dos testes alérgicos.

#### *Seleção de alérgenos para a pesquisa*

A seleção deve ser fundamentada pela avaliação do paciente, considerando quadro clínico e exposição aos alérgenos de importância regional. Os laboratórios disponibilizam extratos de alérgenos para alimentos (p. ex., leite de vaca, clara e gema de ovo etc.), inalantes (p. ex., ácaros domiciliares, barata etc.), insetos (p. ex., abelha, formiga etc.), entre outros.

É importante ressaltar que a detecção de IgE específica somente indica sensibilização. Para diagnóstico do paciente alérgico é necessário que a história clínica e exame físico sejam compatíveis com o resultado do teste.

#### *Técnica de aplicação*

A técnica de puntura é a mais usada pela boa reprodutibilidade e facilidade de aplicação. É o teste preferido na avaliação inicial por ser realizado com mais rapidez, por permitir testar vários alérgenos simultaneamente, oferecer pouco risco de reação sistêmica e ter boa sensibilidade.

Uma gota de cada antígeno é aplicada sobre a pele. Faz-se pressão com uma agulha ou lanceta através da gota sobre a pele. A leitura do resultado deve ser feita 15 a 20 min após a aplicação do extrato do alérgeno na pele. Devem ser registradas a média (em mm) dos maiores e menores diâmetros da pápula e do eritema. Alguns sugerem que sejam marcados à caneta os limites externos da reação e então se aplique uma fita adesiva, a qual será registrada e pode ser conservada na ficha do paciente.

As reações consideradas clinicamente relevantes, e, portanto com resultado positivo, apresentam pápula com 3 mm ou mais de diâmetro médio e 10 mm ou mais de eritema. A resposta positiva reflete a sensibilização do indivíduo ao alérgeno.



O número de alérgenos testados dependerá das características do paciente, como idade, quadro clínico, exposição a alérgenos regionais, entre outros. O teste de punção é um procedimento seguro, embora reações sistêmicas tenham sido observadas.

Para auxiliar na interpretação dos testes, os controles negativo e positivo são necessários. O controle negativo geralmente é o diluente utilizado na conservação do extrato, servindo para detectar dermatografismo e reatividade inespecífica da pele.

O controle positivo ajuda a detectar a supressão por medicamentos e variações na técnica.

Alguns fatores podem influenciar o resultado do teste como idade (há menor reatividade cutânea nos extremos de idade – crianças e idosos) e uso prévio de medicamentos. Anti-histamínicos, corticosteroides tópicos e antidepressivos tricíclicos diminuem ou inibem a reatividade do teste.

### Testes cutâneos de leitura imediata no diagnóstico da alergia alimentar

Os testes cutâneos de leitura imediata representam um método rápido para avaliar a sensibilização a alimentos específicos. A técnica escolhida é a punção, visto que os testes intradérmicos com alimentos são contraindicados pelo risco de reações graves. Uma alternativa é realizar o *prick to prick* com alimento fresco, indicado para frutas e vegetais, em razão da maior sensibilidade. O valor preditivo negativo é maior que 95%, portanto resultados negativos contribuem para afastar a possibilidade de alergia alimentar, enquanto testes positivos geralmente sugerem alergia clínica (até 50% de falso-positivos).

### Testes cutâneos de leitura imediata com medicamentos

O diagnóstico de alergia a medicamentos baseia-se na história clínica detalhada, testes cutâneos de alergia e, eventualmente, provas de provocação. Quando apenas a história e o exame físico não são suficientes para a determinação do fármaco envolvido, os testes estão indicados. É importante salientar que existem controvérsias na literatura quanto à realização de testes *in vivo* em pacientes que apresentaram reações graves, como anafilaxia, síndrome de Stevens-Johnson e síndrome de Lyell. Cada caso deve ser analisado separadamente.

Indicações clínicas:

- **Testes de punção e intradérmicos:** anafilaxia, broncospasmo, conjuntivite não infecciosa, rinite, urticária e angioedema
- **Testes de contato:** dermatite de contato, eritema multiforme, erupção exantematosa (*rash*), erupção fixa por medicamento, reações fotoalérgicas, púrpura/vasculite, síndrome de Stevens-Johnson, necrose epidérmica tóxica.

Os testes cutâneos de leitura imediata avaliam, de modo indireto, a existência de IgE específica, sendo indicados para a investigação das reações imediatas mediadas por IgE. O teste de punção é o meio mais seguro e fácil de testar uma reação imediata por medicamento, mas a sua sensibilidade é moderada. Os testes cutâneos podem ser indicados para avaliação de reações imediatas provocadas pelas seguintes substâncias: penicilinas, relaxantes musculares, insulina, protamina, heparina, estreptoquinase e quimiopapaína.

Os testes de leitura imediata para penicilinas são padronizados e estão disponíveis comercialmente na Europa. No Brasil, o Ministério da Saúde desenvolveu um protocolo para investigação de reações imediatas à penicilina, o qual utiliza a penicilina G potássica para a realização dos testes cutâneos de leitura imediata com sensibilidade e especificidades satisfatórias.

Os anestésicos locais são, com frequência, considerados responsáveis por reações anafiláticas (Quadro 33.1). Porém, os

### Quadro 33.1 - Dois principais grupos de anestésicos locais e seus representantes.

Grupo éster de ácido benzoico	Grupo amida
Benzocaína	Lidocaína
Tetracaína	Bupivacaína
Procaína	Mepivacaína
2-cloroprocaína	Levobupivacaína
Cocaína	Ropivacaína
Propacaína	Editocaína
	Prilocaina

Adaptado de Greenberger, 2002.

maiores estudos realizados com pacientes que tinham história sugestiva de reação a anestésicos locais sugeriu inexistência de reações mediadas por IgE na maioria das ocorrências. Desse modo, nos casos suspeitos, a conduta é identificar o anestésico utilizado e substituí-lo por outro de um grupo diferente. Se o anestésico for do grupo éster (PABA), deve-se trocar pelo grupo amida. Se for do grupo amida, pode-se substituir pelo mesmo grupo.

### Testes cutâneos intradérmicos

São testes menos utilizados, no entanto também são indicados para pesquisa de IgE específica, sobretudo no diagnóstico de alergia a veneno de insetos (formiga, abelha e vespa) e alguns medicamentos. São mais sensíveis, porém menos seguros. Também estão indicados para determinação da dose inicial da imunoterapia específica para insetos.

O teste intradérmico deve ser sempre precedido pelo teste de punção, aplicado quando este é negativo em pacientes com história compatível com alergia, permitindo a identificação de um grande número de pacientes alérgicos com teste de punção pouco sensível. A sensibilidade a extratos alergênicos de baixa potência também pode ser avaliada por meio desse método, que se utiliza de seringa com agulha hipodérmica de 0,5 ou 1,0 mL, formando ângulo de 45° com a pele, com bisel para baixo. Geralmente é realizado na porção superior do braço ou na superfície volar do antebraço. O volume injetado varia entre 0,01 e 0,05 mL, produzindo pápula de 2 a 3 mm de diâmetro e, em virtude da profundidade e da introdução de grandes quantidades do alérgeno, existe a possibilidade de reação sistêmica.

A leitura é feita em cruzes:

- Eritema maior que o controle: +
- Eritema maior que 21 mm: ++
- Eritema e edema: +++
- Eritema, edema e pseudópodes: ++++

A maior sensibilidade do teste intradérmico se deve, em parte, à introdução de maiores volumes do alérgeno em relação aos testes de punção. A sensibilidade e a especificidade variam de acordo com o alérgeno estudado, com a padronização, a dose e o critério de positividade.

Algumas variáveis podem interferir no resultado do teste como idade do indivíduo, área do corpo a ser aplicado o teste, pigmentação da pele, medicações e qualidade do extrato.

### Testes cutâneos de leitura tardia

São testes utilizados para pesquisa de respostas mediadas por células.



### Teste de contato (patch test)

O teste de contato visa reproduzir a lesão da alergia suspeita por meio da aplicação do alérgeno na pele do indivíduo. Utilizado para auxiliar, principalmente, no diagnóstico de dermatites de contato, mas pode ainda ser útil em alguns casos de alergia alimentar e a medicamentos.

A seleção de alérgenos a ser testada é direcionada pela anamnese do paciente e exame físico, e os antígenos estão disponíveis em baterias padronizadas. A interpretação dos resultados requer experiência por parte do realizador do exame.

Esse teste é feito geralmente no dorso, evitando-se a pele da região paraespinal, distando aproximadamente 2,5 cm da área da coluna vertebral. As fitas para o teste devem ser hipoalergênicas e adesivas, nas quais se coloca o alérgeno em papel de filtro com 1 cm<sup>2</sup> de área, aderidas a uma distância de 1 cm entre cada substância a ser testada. Existem fitas prontas no mercado, como o Finn Chamber®, oclusivo, contendo pequenas câmaras de alumínio de 8 mm de diâmetro, e o *true test*. O paciente deve evitar umedecer o local do teste. A leitura é feita em 48 h, após 20 min da retirada da fita, sendo a área demarcada com caneta. Uma nova leitura é feita em 72 h e em 96 h, pois cerca de 30% dos alérgenos que são negativos na leitura de 48 h tornam-se positivos com 96 h. Por outro lado, algumas reações que são positivas em 48 h tornam-se negativas em 96 h, considerando-se, nestes casos, a dermatite de contato de causa irritativa. O *patch* positivo requer correlação entre a exposição à substância e o surgimento de lesão.

A leitura das reações é feita com a seguinte representação:

- Negativo: –
- Eritema: +
- Eritema e edema: ++
- Eritema, edema e vesículas: +++
- Eritema, edema, vesículas e ulcerações: ++++

Para a realização do teste de contato, utiliza-se a bateria padrão, constituída por metais, tópicos, corantes, resinas e borracha. Nos casos de cosméticos, deve-se utilizá-los puros, mas nunca usar material na realização dos testes de contato do qual não se conheça a composição química. São utilizados cerca de 20 a 30 agentes, que identificam 50 a 70% das causas de dermatite de contato alérgica. As substâncias devem ser guardadas em frascos escuros protegidos da luz – as líquidas devem ser trocadas a cada 6 meses e as sólidas a cada 5 anos.

São causas de resultados falso-negativos: técnica inadequada, baixa concentração ou baixa quantidade de substância a ser testada, uso de corticosteroides tópico ou sistêmico em doses altas.

Causas de resultados falso-positivos: testes com substâncias irritantes, reação à fita adesiva, impurezas no material a ser testado e o denominado *angry-back*, em que um teste fortemente irritante provoca reação inespecífica nos testes ao redor.

Os testes de contato podem apresentar complicações, como exacerbação da dermatose, hipo ou hiperpigmentação no local do teste, ulceração e infecção secundária.

O teste atópico de contato (*atopy patch test*) é uma variação do teste de contato. Alimentos podem ser testados em pequenas câmaras e removidos após 48 h. Esse teste é especialmente indicado na avaliação dos quadros mistos ou não mediados por IgE, mas ainda é necessária melhor padronização.

### Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia

Os testes cutâneos de hipersensibilidade tardia são utilizados para avaliar a imunidade celular. A anergia comprova

a deficiência na imunidade celular e/ou a não sensibilização prévia. Para a avaliação da imunidade tardia são injetados, por via intradérmica, na face volar do antebraço, antígenos como PPD, estreptoquinase-estreptodornase (SK-SD), candidina, histoplasmina e tricoftina. Estes são antígenos aos quais a maioria dos indivíduos já se sensibilizou.

### Testes de provocação

Os testes de provocação são parte do arsenal disponível para o diagnóstico de alergia, sendo instrumentos fundamentais para identificar os processos mediados ou não por IgE. Um aspecto importante a ser ressaltado é o extremo cuidado que se deve ter ao indicar um teste de provocação, pois se trata de procedimento que pode envolver riscos de acordo com a sintomatologia apresentada pelo paciente.

#### Provocação com alimentos

Consiste na administração fracionada do alimento suspeito, em doses crescentes, sob supervisão médica. São considerados positivos quando reproduzem os sintomas relatados na anamnese. A escolha do alimento para a realização do teste é determinada pela história, pela pesquisa de IgE específica *in vivo* ou *in vitro*, ou pela dieta de restrição (restrição do alimento e correlação com a melhora clínica). Representam procedimentos de risco em razão da possibilidade de manifestações clínicas graves. Portanto, devem ser sempre realizados por um médico treinado, dispondo de equipamentos e medicação para tratamento de emergência.

Podem ser realizados de três maneiras:

- *Provocação aberta*: o alimento é oferecido ao paciente sem necessidade de placebo
- *Teste simples-cego*: o alimento é oferecido ao paciente com uma fase de placebo. Nesse caso, apenas o paciente desconhece em que momento o alimento suspeito é oferecido
- *Teste de provocação duplo-cego placebo-controlado*: o alimento é oferecido ao paciente com uma fase de placebo. O médico e o paciente desconhecem em que momento o alimento suspeito é oferecido. É o padrão de referência para o diagnóstico de alergia alimentar.

#### Provocação com medicamentos

Quando os testes cutâneos não são conclusivos ou não estão disponíveis, o diagnóstico definitivo de uma reação de hipersensibilidade pode ser fornecido pelo teste de provocação. Este teste consiste em administrar a substância suspeita ou uma relacionada com a que o paciente apresentou a reação. Deve ser sempre realizado por um médico especialista e experiente, em um ambiente hospitalar preparado para atendimento de emergência. A European Network for Drug Allergy (ENDA) indica os testes de provocação para situações específicas, relacionadas a seguir

- Excluir a reação de hipersensibilidade em pacientes com história não sugestiva de hipersensibilidade ao medicamento e em pacientes com sintomas inespecíficos, como sintomas vagais durante a aplicação de anestesia local
- Fornecer substâncias farmacológicas e/ou estruturalmente não relacionadas e seguras em casos de hipersensibilidade comprovada
- Excluir a reatividade cruzada de substâncias relacionadas em casos de hipersensibilidade comprovada
- Estabelecer o diagnóstico em pacientes com história sugestiva de reações a medicamentos e testes negativos.



### Broncoprovocação

Teste que visa avaliar a resposta específica ao alérgeno, especialmente no diagnóstico diferencial de asma ocupacional, a hiper-responsividade brônquica inespecífica (histamina, metacolina ou exercício). O teste deve seguir protocolo padronizado para cada alérgeno e ser realizado na presença de um médico. No caso de broncoprovocação específica, o paciente deve ficar em observação pelo período de 8 h, para que reações tardias sejam registradas.

### Teste do autossoro

O teste do autossoro pode ser utilizado na investigação de urticária crônica, quando a suspeita for de etiologia autoimune. É feito com o soro do próprio paciente. Quando positivo, indica a existência de autoanticorpos funcionais e resposta caracterizada pelo aparecimento de prurido cutâneo, eritema e pápula. Essa reação é o resultado da desgranulação de mastócitos decorrente dos autoanticorpos da classe IgG antirreceptor para IgE ou a própria IgE.

### ▪ Testes *in vitro*

Apesar de os testes *in vivo* serem muito utilizados, devido à obtenção de resultados rápidos e por serem menos dispendiosos, apresentam algumas vantagens. Eles podem ser aplicados nos casos em que o paciente tenha um histórico de anafilaxia, pois ele não é exposto a nenhum risco de desenvolver uma reação alérgica durante a sua realização. Além disso, os resultados geralmente não são afetados pelas medicações de que o paciente esteja fazendo uso, como os anti-histamínicos e antidepressivos. Os testes *in vitro* devem ser utilizados também nos pacientes que tenham doença cutânea generalizada ou estejam imunossuprimidos.

Do ponto de vista do paciente, são mais cómodos, pois não há a necessidade de se agendar uma nova consulta para sua realização. Porém devem ser interpretados em associação à história clínica, não podendo ser feito um diagnóstico apenas com os resultados laboratoriais.

### Dosagem de IgE total

O nível de IgE no soro varia com a idade e tende a flutuar em consequência de contato com antígenos. A maior parte da IgE produzida se fixa a receptores de alta afinidade, presentes na membrana celular de mastócitos e basófilos. No entanto, o nível de IgE no soro está relacionado com a IgE total produzida, refletindo a quantidade total de IgE disponível em nível celular.

A dosagem de IgE sérica total não pode ser feita por imunodifusão radial como as outras classes de imunoglobulinas pela quantidade muito baixa existente no soro. O método de escolha é o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent test*). O resultado encontrado é convertido para unidades internacionais – UI/mL (ou kUI/L) ou ng/mL (em que 1 UI/mL = 2,44 ng/mL).

Indivíduos atópicos se caracterizam por desenvolver altos títulos de IgE. Desse modo, a simples determinação de IgE pode discriminar indivíduos atópicos de não atópicos, entretanto, existe um alto grau de sobreposição entre as duas populações. Níveis elevados sugerem doença alérgica, mas não informam qual patologia ou a que alérgenos o paciente é sensibilizado.

A aplicação clínica da dosagem de IgE sérica total tem valor modesto. Observam-se altos níveis de IgE sérica total na dermatite atópica, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA),

parasitoses intestinais e condições mais raras, como síndrome de hiper-IgE e de Wiskott-Aldrich, além de algumas doenças malignas. Sua dosagem seriada pode ser utilizada para avaliar resposta à terapêutica instituída. Os níveis de IgE total também são necessários para a indicação ou não da terapêutica com o anticorpo monoclonal omalizumabe e determinação da dose inicial desse medicamento.

### Dosagem de IgE específica

A maioria dos pacientes que apresenta sintomas após a exposição a um determinado alérgeno tem IgE específica para aquele alérgeno demonstrável, fazendo com que essa determinação seja um instrumento importante para o diagnóstico das doenças alérgicas. A dosagem sérica de IgE específica tem boa sensibilidade, correspondendo, em média, a 70 a 75% com o teste de punção ou provocação. A interpretação dos resultados deve ser feita frente à história clínica do paciente e exame físico, e, em alguns casos, sintomas apresentados à exposição natural ao alérgeno.

A dosagem de IgE específica *in vitro* surgiu no final dos anos 1960, e a detecção era feita por meio de radioimunoensaio, com detecção de anti-IgE ou alérgeno imobilizado em fase sólida. Ainda hoje os imunoenaios são utilizados, mas com diferentes métodos de detecção dos complexos antígeno-anticorpo (enzima, fluorescência ou luminescência). Os imunoenaios de primeira geração eram apenas qualitativos (RAST, MAST, EAST), os de segunda (AutoCAP, Alastat, HYTech, Matrix, MagicLite) semiquantitativos e, atualmente, temos os chamados de terceira geração, cujos representantes mais amplamente utilizados são ImmunoCAP System® (Thermo Fisher Scientific – antiga Pharmacia, Uppsala, Suécia) e o Immulite 2000® (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA).

Esses novos métodos são mais rápidos, com melhor precisão, acurácia e sensibilidade analítica. O princípio da técnica se baseia no acoplamento covalente do alérgeno de interesse a uma superfície fixa que reage com a IgE específica da amostra de soro. Posteriormente são adicionados anticorpos anti-IgE conjugados a uma enzima e o substrato. A reação é interrompida para aferição da fluorescência. É importante salientar que as metodologias não são iguais e que os ensaios podem detectar diferentes populações de anticorpos IgE específicos, portanto, a interpretação dos resultados não é necessariamente a mesma.

A utilização dessas novas metodologias permitiu mensurações quantitativas e reprodutíveis de IgE específica no soro do paciente, o que tem permitido aos pesquisadores avaliar a relação entre os níveis de IgE alérgeno-específicos e a probabilidade do desencadeamento de uma reação alérgica clinicamente relevante para o paciente após a exposição alérgica. Essas correlações têm sido feitas principalmente em alergia alimentar, comparando-se ao padrão-ouro de diagnóstico, que é a provocação oral duplo-cego placebo-controlada.

A potência e a estabilidade entre os extratos alérgicos disponíveis comercialmente dependem da alergenidade intrínseca do alérgeno, sendo mais alta nos polens, alimentos anafilatogênicos estáveis, ácaros domiciliares, alguns alérgenos epidérmicos e fungos do que em venenos, medicamentos e substâncias químicas.

Os resultados são expressos em unidades internacionais (kUI/L, em que 1 kUI = 2,44 µg/L de IgE sérica), e quanto maior o valor, maior é a quantidade de IgE específica na amostra. Esses resultados são comparados com valores predeterminados, em que são classificados de 0 a 6 (Quadro 33.2).



**Quadro 33.2 - Classificação de acordo com a concentração de IgE específica dosada pelo método ImmunoCap-Phadia®.**

Classes IgE	Concentração (kUI/ℓ)	Resultado	Interpretação
0	< 0,35	Indetectável	Negativo
1	0,35 a 0,7	Fraco	Correlação duvidosa*
2	0,7 a 3,5	Moderado	Correlação menos duvidosa*
3	3,5 a 17,5	Forte	Positivo
4	17,5 a 50	Muito forte	Positivo
5	50 a 100	Muito forte	Positivo
6	> 100	Muito forte	Positivo

\*Pesquisar outros alérgenos quando a história for muito sugestiva de alergia. Fonte: Thermo Fisher Scientific.

Por não necessitar de grande quantidade de material biológico para a realização do ensaio e podendo ser repetida quando necessário, além da sua aplicação para a pesquisa de diferentes alérgenos (ácaros, alimentos, fungos, insetos, epitélios de animais etc.), essa metodologia é muito utilizada atualmente.

Vantagens da determinação sérica da IgE específica:

- Ao contrário do teste de punção, não determina riscos de desencadear reação alérgica no paciente, especialmente quando ele tem história de anafilaxia ou reação grave à exposição alérgica
- Não sofre influência das medicações que estejam sendo utilizadas pelo paciente (anti-histamínicos, antidepressivos, por exemplo)
- Não depende da integridade da pele nem é influenciada pela doença cutânea. Testes cutâneos em crianças menores que 2 anos de idade podem não refletir sua sensibilidade alérgica. É melhor nos pacientes que apresentam dermatite atópica disseminada ou dermatografismo.

### Teste de inibição da IgE específica

Pode ser utilizado para determinar a especificidade da ligação com IgE. Incuba-se uma pequena quantidade do alérgeno ao soro do paciente e observa-se a inibição da ligação da IgE específica, a qual reconhece a proteína alérgica. Teoricamente, algumas preparações de alérgenos podem ter substâncias como lectinas que podem determinar ligação não específica de IgE.

Este método pode ser usado também no diagnóstico de reatividade cruzada entre diferentes fontes de alérgenos, escolhidos de acordo com a suspeita clínica com base na anamnese do paciente. Para tanto, o soro do paciente é pré-incubado com o alérgeno previamente diagnosticado e é feito o ensaio com o alérgeno suspeito de apresentar reatividade cruzada. Se a quantidade de anticorpos ligados com o alérgeno após a pré-incubação com outro alérgeno diminuir, ou for suprimida, indicará um grau de reatividade cruzada.

### Dosagem de IgG específica

IgG específica no soro indica extensa exposição ao alérgeno específico.

As técnicas para detecção de IgG específica são as mesmas utilizadas para a dosagem de IgE específica, porém são adicionados anticorpos monoclonais anti-IgG ou específicos para uma das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 ou

IgG4) para a quantificação de anticorpos específicos. A IgG alérgeno-específica pode ser detectada mais facilmente que a IgE específica, pois geralmente está presente em concentrações mais elevadas. As dosagens são feitas em unidades arbitrárias.

Embora alguns autores acreditem que as dosagens de IgG e especialmente de IgG4 específicas possam ser úteis no diagnóstico de alergia alimentar, elas não têm relevância clínica, já que a existência desses anticorpos não se correlaciona com a presença de manifestações clínicas. Além de não haver dados convincentes sobre a capacidade de IgG4 humana liberar histamina, não há estudos controlados sobre o valor diagnóstico da IgG4 específica na alergia alimentar. Aparentemente, a presença de IgG4 específica para alimentos indica que o organismo tem sido exposto repetidamente a componentes do alimento, os quais são reconhecidos como proteínas estranhas pelo sistema imune, não devendo indicar hipersensibilidade, mas tolerância imunológica.

Outra aplicação da dosagem de IgG específica que tem sido estudada, especialmente da IgG4 específica, é no acompanhamento da imunoterapia alérgeno-específica, principalmente para veneno de insetos. Entretanto, são necessárias a confirmação e a validação dos valores preditivos de IgG4 para eficácia terapêutica da imunoterapia.

### Microarranjo de alérgenos

A tecnologia de microarranjos (*microarray*) permite a pesquisa de IgE específica para diversos componentes alergênicos (ou peptídios) de uma só vez e com mínima quantidade de soro em vez da pesquisa de alguns alérgenos totais separadamente. O *biochip* atualmente disponível comercialmente é o ImmunoCAP ISAC® (Immuno Solid-phase Allergy Chip) da Thermo Fisher Scientific. Para a confecção desse *biochip* são utilizados apenas alérgenos purificados recombinantes ou naturais. Contém 103 alérgenos, sendo 47 alérgenos alimentares. Essa tecnologia tem se mostrado útil no diagnóstico da sensibilização a múltiplos alérgenos, em especial na avaliação de reatividade cruzada entre alérgenos.

A tecnologia de microarranjos permite a avaliação do repertório de células B para um determinado conjunto de alérgenos. Microarranjos de peptídios e proteínas podem ser particularmente úteis na melhor compreensão associada às mudanças do repertório de anticorpos na tolerância natural ou induzida por imunoterapia. Os microarranjos poderão ter ainda algumas centenas de proteínas alergênicas imobilizadas, levantando uma questão sobre como isso influenciará o diagnóstico das doenças alérgicas. Certamente, o uso regular desses microarranjos contribuirá para a melhor compreensão da causa e desenvolvimento de tais doenças, permitindo a personalização do tratamento de cada paciente.

### Linfoproliferação

Para o diagnóstico das reações por hipersensibilidade tipo IV (celular) pode-se utilizar os ensaios de linfoproliferação (cultura de linfócitos), estimulando-se as células com mitógenos e/ou antígenos (alérgenos). A ativação das células T está associada a sua proliferação e secreção de citocinas. Proliferação linfocitária tem sido relatada com frequência variável em associação com exposição a substâncias e reações de hipersensibilidade. O valor dessa reação como método diagnóstico é muitas vezes prejudicado pela falta de um antígeno completo relevante, isto é, "haptênizado", com o qual poderíamos realizar o teste; entretanto, quando positivo, ele provavelmente reflete o que ocorre *in vivo*.



Essa metodologia, até o momento, tem pouca aplicabilidade clínica, sendo utilizada principalmente em pesquisas.

### Dosagem de triptase

A triptase é produzida por mastócitos e basófilos, entretanto a expressão em mastócitos é aproximadamente 500× maior que em basófilos. Quando os mastócitos são ativados, a triptase é um dos mediadores liberados juntamente com histamina, prostaglandinas e leucotrienos e, por isso, é considerada um bom marcador de ativação de mastócitos. Várias formas de triptase foram descritas, mas as de relevância clínica são a betatriptase (maior) e a alfatriptase (menor). A betatriptase é liberada durante a ativação de mastócitos por alérgenos, enquanto a alfatriptase geralmente está elevada nos pacientes portadores de mastocitose sistêmica.

A triptase deve ser dosada de 30 min a 4 h após o início da reação alérgica (especialmente na anafilaxia acompanhada de hipotensão), pois apresenta declínio rápido. A triptase pode também ser detectada em 15 a 30 min após provocação alérgica, com declínio em 2 h. Pode ser encontrada também no lavado broncoalveolar, fluido nasal e lágrimas, mas a dosagem nesses fluidos ainda não tem utilidade clínica.

Os níveis séricos normais de triptase variam de 1 a 15 ng/mL. Após uma anafilaxia, os níveis de triptase podem estar marginalmente elevados até níveis acima de 100 ng/mL. Esse teste é útil para diagnóstico de reações de anafilaxia e mastocitose sistêmica.

### Teste de liberação de histamina

Assim como a triptase, a histamina é um mediador químico liberado na resposta inflamatória, principalmente por basófilos. Essa liberação ocorre após o alérgeno estabelecer uma ponte entre as moléculas de IgE, que estão ligadas ao seu receptor específico na superfície celular.

A liberação de histamina dos basófilos é um valioso instrumento de pesquisa *in vitro* da alergia. Na maioria dos estudos, acrescenta-se alérgeno ou antígeno aos leucócitos do sangue periférico, com a dosagem direta da histamina no sobrenadante. Em indivíduos alérgicos a polens, observa-se boa correlação clínica entre a gravidade dos sintomas e a quantidade de histamina liberada *in vitro*.

O critério para considerar uma amostra positiva varia de 1 a 20% do total de histamina liberada, porém esses valores podem diferir para alguns alérgenos, dependendo de suas concentrações.

Pode ser utilizado também como medida da especificidade do alérgeno, podendo ser comparado aos testes de inibição. Esse método ainda tem pouca aplicação clínica.

### Teste de ativação de basófilos

A base de diagnóstico de alergia pela citometria de fluxo é a quantificação de alterações na expressão de marcadores na superfície dos basófilos. Essas células, quando encontram o alérgeno específico, reconhecido pela IgE, não só segregam e geram mediadores quantificáveis, como aumentam a expressão de diferentes marcadores de superfície (p. ex., CD63, CD69 e CD203c). Destes, os mais utilizados são o CD63 e o CD203c.

Ambas as moléculas são encontradas em pequena quantidade na superfície celular dos basófilos, pois estão ligadas à membrana dos grânulos intracitoplasmáticos. Porém, após ativação, com a fusão dos grânulos com a membrana celular, essas moléculas são translocadas para a superfície. Apesar de

o CD203c ser expresso exclusivamente em basófilos, preconiza-se a utilização do CD63, por ser menos expresso na superfície celular durante o repouso.

As células são incubadas com o alérgeno de interesse, em concentração predefinida, um controle positivo (FMLP) e negativo. Após a incubação, são feitas lavagens e as células são marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD45, anti-IgE e anti-CD63 marcados com fluorocromos para posterior identificação em citômetro de fluxo.

O teste de ativação de basófilos é um teste *in vitro*, simples e rápido, e tem sido sugerido como método útil no diagnóstico de alergia alimentar, pólen, ácaros, medicamentos, látex e também a himenópteros. O soro de pacientes portadores de urticária crônica idiopática também apresenta autoanticorpos ativadores de basófilos.

### Dosagem de ECP

Os grânulos dos eosinófilos contêm diversas proteínas, que, após ativação celular, são secretadas para o meio extracelular. A ECP (proteína catiônica eosinofílica) foi descrita como molécula efetora que indica o final da desgranulação dos eosinófilos. Esta proteína é altamente citotóxica, podendo levar a inflamação crônica. Sua liberação parece estar associada à ativação dos eosinófilos por meio da ligação de anticorpos IgG ao seu receptor específico. Níveis elevados de ECP indicam doença alérgica inflamatória. ECP pode ser detectada no soro, escarro e secreções nasais nos indivíduos que apresentam fase tardia da reação alérgica (6 a 24 h após exposição).

A dosagem de ECP pode ser feita incubando-se o soro do paciente com o alérgeno a ser pesquisado em uma superfície fixa contendo anticorpos monoclonais anti-ECP. Após incubação, a reação é interrompida para aferição da fluorescência. Valores acima de 15 mg/L devem ser considerados elevados. Pode também ser dosada utilizando-se um *kit* comercializado pela Thermo Fisher Scientific (ImmunoCAP-ECP®).

A mensuração dos níveis séricos de ECP pode ser utilizada para diagnóstico e monitoramento de asma, dermatite atópica e verificar pacientes que não estejam aderindo ao tratamento, mas com limitada utilidade clínica.

### Immunoblot

A técnica combina a seletividade da eletroforese em gel com a especificidade da interação antígeno-anticorpo. Utilizada para detectar e caracterizar proteínas, pode ser aplicada para os mais diferentes fins, como a identificação de proteínas soro-específicas no diagnóstico de doenças e reações alérgicas.

As proteínas, separadas por tamanho, são transferidas do gel para um suporte estável como papel ou nitrocelulose. Para a detecção do anticorpo de interesse, incuba-se a membrana contendo os antígenos com a amostra a ser estudada e, após lavagem, um anticorpo anti-IgE humano marcado com enzima ou radioisótopo é adicionado.

Os experimentos de *immunoblot* são importantes, pois permitem obter informação mais detalhada do que a pura detecção de anticorpos específicos. Além da confirmação da existência de bandas alérgicas específicas, pode ser utilizado nos estudos de reatividade cruzada e no monitoramento da imunoterapia.

Análises de *immunoblot* para reatividade a IgE específicas contra extratos de alérgenos, utilizando-se anti-IgE humanos marcados após eletroforese do alérgeno em questão, permitiram a identificação e a discriminação de moléculas alérgicas a partir de uma única fonte, além da detecção de padrões individuais de sensibilização a moléculas alérgicas específicas em fontes diferentes com reatividade cruzada.



**Quadro 33.3 - Testes *in vitro* para diagnóstico de reações alérgicas.**

Metodologias	Característica	Vantagens	Desvantagens
Dosagem de IgE total	Quantitativo	Automatizado Demonstra sensibilização	Associação a parasitoses
Dosagem de IgE específica	Quantitativo	Automação	Baixa sensibilidade para alguns alérgenos
	Qualitativo	Armazenamento do soro Pouco material biológico Diagnóstico de diferentes alérgenos	—
Dosagem de IgG específica	Quantitativo	Automatizado	—
	Qualitativo		
Linfoproliferação	Quantitativo	Diagnóstico de hipersensibilidade tipo IV	Demorado
	Qualitativo		
Tryptase	Quantitativo	Automatizado	Associação a outros testes
		Diagnóstico de reações anafiláticas	
		Monitoramento da asma	
Liberação de histamina	Quantitativo	Demonstra sensibilização	Demorado
	Qualitativo	Diagnóstico de diferentes alérgenos	Processamento em 24 h Falso-negativos
Ativação de basófilos	Quantitativo	Simples Rápido Pesquisa de diferentes alérgenos	Processamento em 24 h
	Qualitativo		
ECP	Quantitativo	Automatizado	—
Immunoblot	Qualitativo	Identificação de novos alérgenos	Demorado
		Monitoramento do tratamento	Caro

Em muitos casos, a sensibilização geral a proteínas imunodominantes bem como a sensibilização individual a alérgenos menores podem ser observadas utilizando-se o *immunoblot*. Além disso, o padrão de reatividade a IgE específico pode ser diferenciado entre pacientes com alergias a um mesmo extrato total.

Entretanto, a detecção de IgE específico pelo *immunoblot* não apresenta relevância clínica, porque um único epítipo de IgE é suficiente para causar reatividade *in vitro*, não provocando necessariamente uma manifestação clínica.

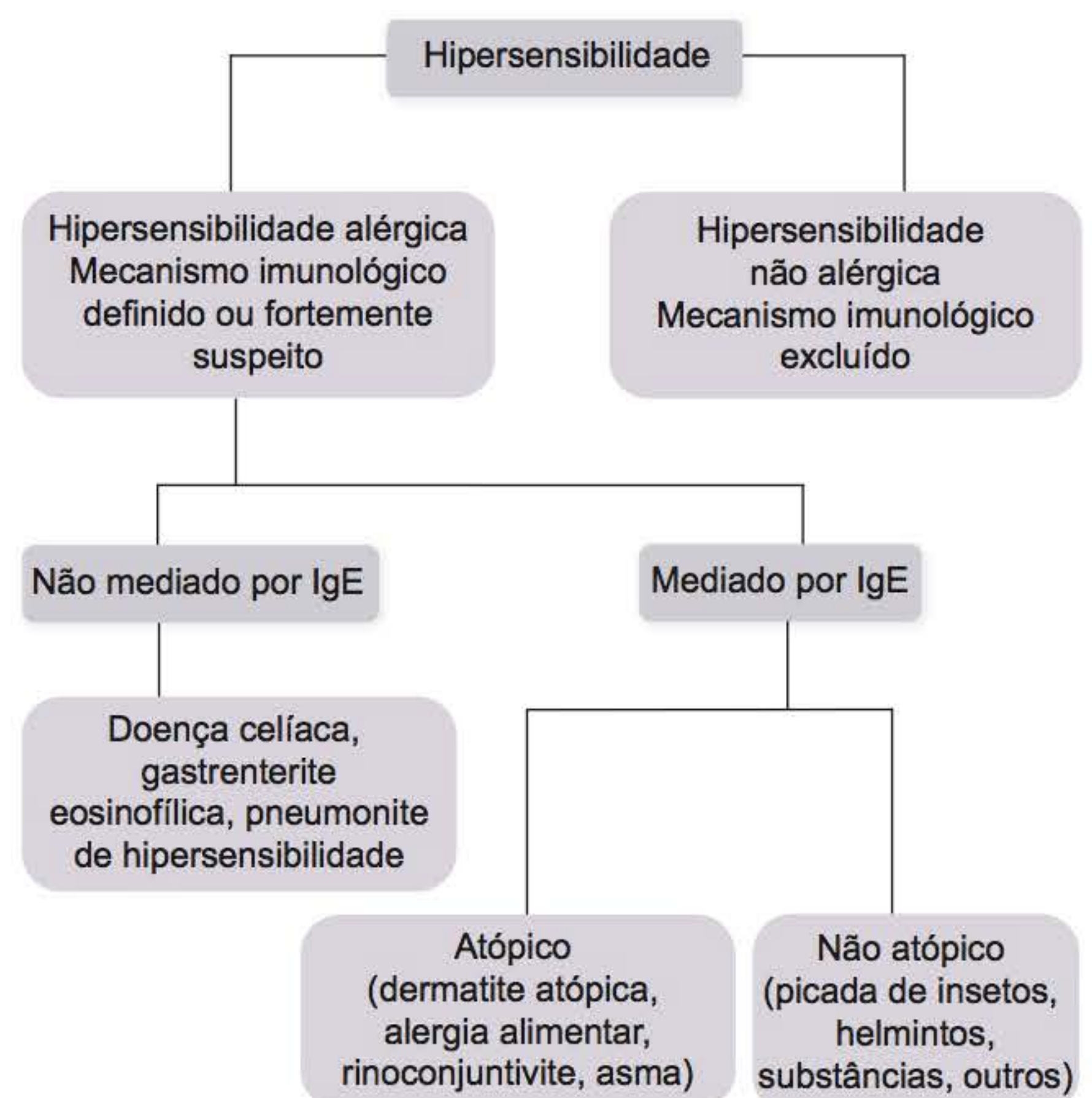
O Quadro 33.3 resume os testes *in vitro* para diagnóstico de reações alérgicas.

### ■ Testes diagnósticos sem evidência de validade

Segundo a última publicação (2008) dos Parâmetros Práticos de Testes Diagnósticos em Alergia da Academia Americana de Alergia, Asma e Imunologia (AAAAI) e Colégio Americano de Alergia, Asma e Imunologia (ACAAI), os procedimentos que não apresentam evidências no diagnóstico de alergia são: testes citotóxicos, provocação-neutralização, teste eletrodérmico, cinesiologia aplicada, iridologia, análise do cabelo e dosagem de anticorpos IgG, IgG4 e relação IgG/IgG4 específicas para alimentos.

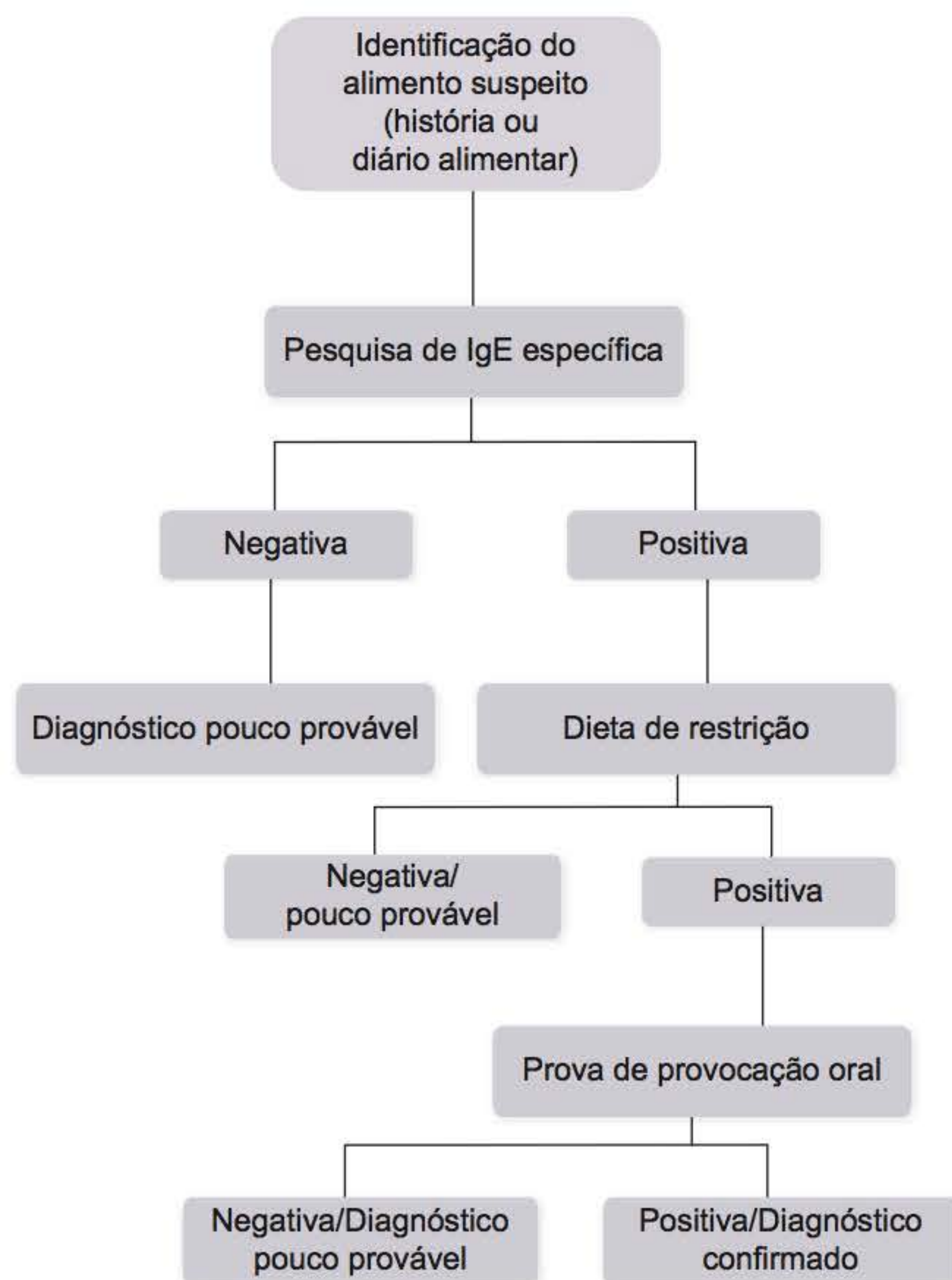
### ■ Algoritmos do diagnóstico de doenças alérgicas

Os algoritmos de doenças alérgicas são apresentados nas Figuras 33.1, 33.2 e 33.3.

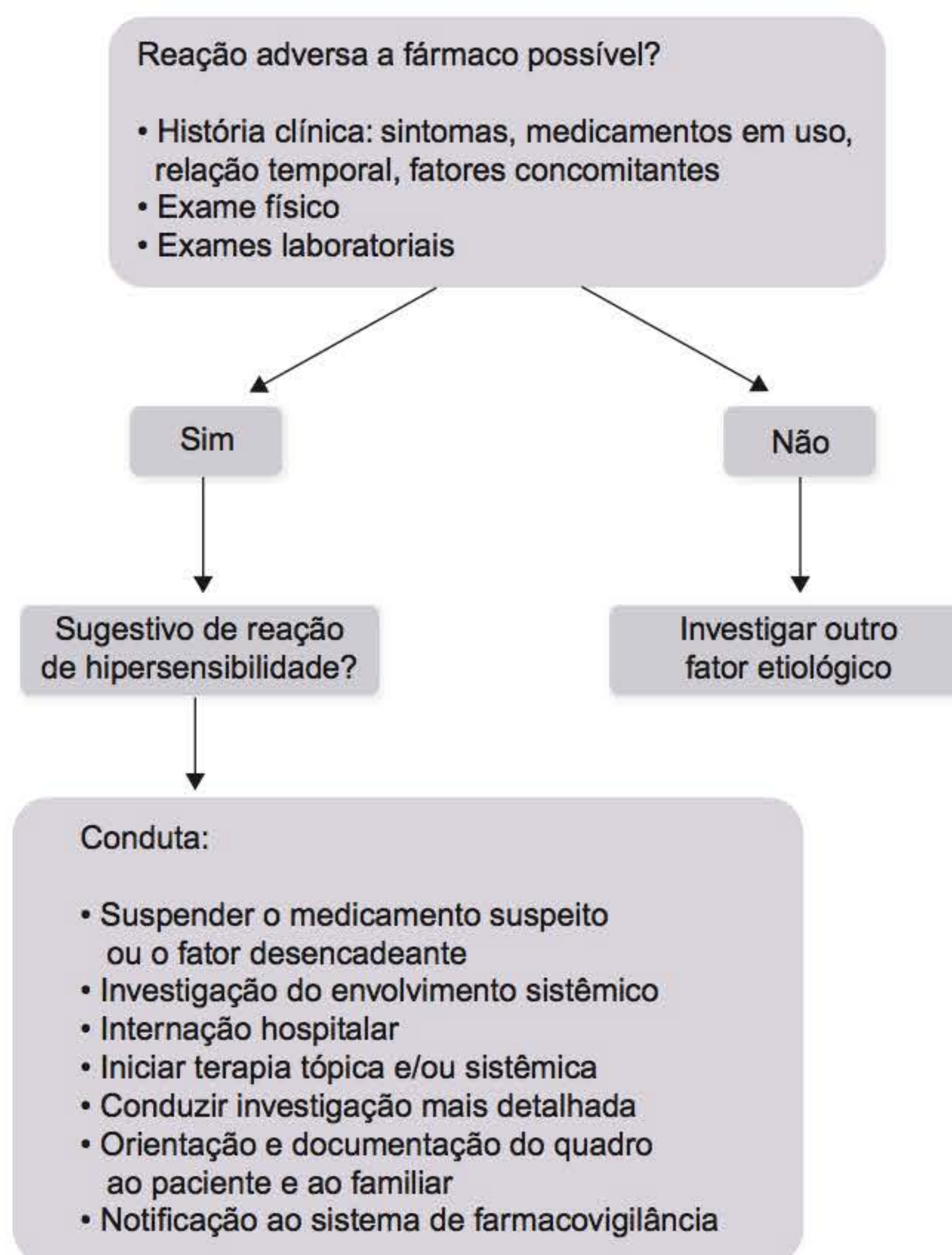


**Figura 33.1** Algoritmo do diagnóstico de doenças alérgicas. Reações de hipersensibilidade. Adaptada de Johansson, 2004.





**Figura 33.2** Algoritmo do diagnóstico de alergia alimentar mediada por IgE. Adaptada de Yang *et al.*, 2009.



**Figura 33.3** Abordagem inicial das reações adversas a fármacos. Cortesia da Dra. LK Tanno.

## ► Bibliografia

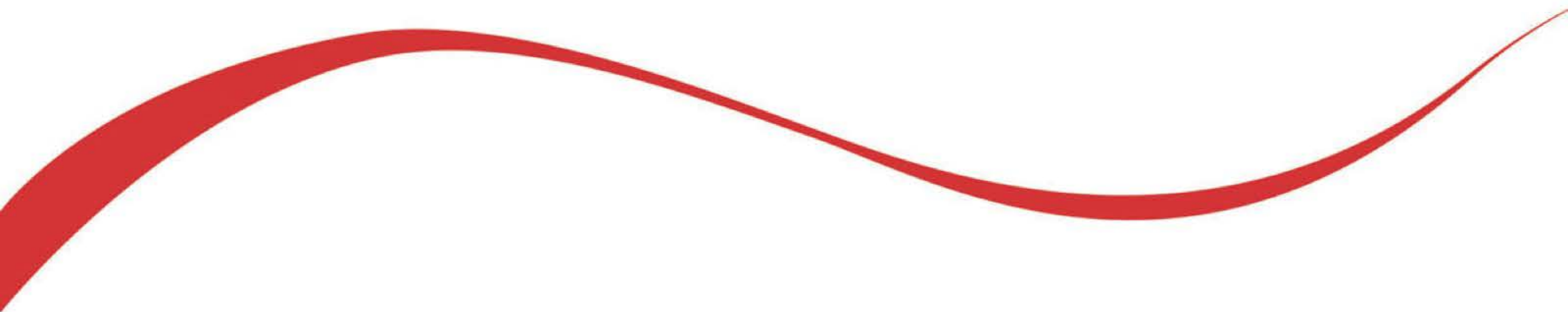
- Aberer W, Bircher A, Romano A *et al.* Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* 2003; 58:854-863.
- Atkins D. Food Allergy: diagnosis and management. *Prim Care Clin Office Pract* 2008; (35): 119-140.
- Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI *et al.* Allergy Diagnostic Testing: An Updated Practice Parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100: S1-S148.
- Brockow K, Romano A, Blanca M *et al.* General Considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002; 57:45-51.
- Church MK, Levi-Schaffer F. Updates on cells and cytokines. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:155-160.
- Cohn JR, Bahna SL, Wallace DV *et al.* Ad Hoc Committee of the Practice, Diagnostics and Therapeutics Committee AAAAI Work Group Report: Allergy Diagnosis in Clinical Practice Nov 2006.
- Cohon A, Agondi RC. Abordagem do paciente alérgico. In: *Clínica Médica*, 1 ed. Martins MA, Carrilho FJ, Alves VAF *et al.* (Ed.). Manole 2009; Vol 7:4-12.
- Daher S, Galvão C, Abe A *et al.* Diagnósticos em Doenças Alérgicas Mediadas por IgE. *Rev. Bras. Aler. Imunopatol* 2009; 32(1): 3-8.
- Demoly P, Lebel B, Arnoux B. Allergen-induced mediator release tests. *Allergy* 2003; 58:553-558.
- Demoly P, Lebel B, Messaad D *et al.* Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy* 1999; 54:500-506.
- Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH *et al.* *In vitro* allergy diagnosis: should we follow the flow? *J Clin Exp Allergy* 2004; 34: 332-339.
- Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH *et al.* Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Eur J Allergy Clin Immunol* 2006; 61(9):1028-1039.
- Faria E. Drug allergy diagnosis: an Update. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol* 2008; 31(4): 133-138.
- Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* 1998; 51:213-339.
- Gleich GJ, Flavahan NA, Fujisawa T *et al.* The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: A model for bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:776-781.
- Greenberger PA. Allergic reactions to individual Drugs: Low molecular weight. *Paterson's Allergic Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins, 6 ed. USA, 2002. p. 355-357.
- Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (2 suppl 2): 284-296.
- Hamilton RG, Adkinson NFJR. Clinical laboratory assessment of IgE dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 687-701.
- Hamilton RG, Adkinson NFJR. *In vitro* assays for the diagnosis of IgE mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(3): 639-640.
- Helmuth G, Kaufmann R, Kalveram CM. Adverse reactions to local anesthetics: analysis of 197 cases. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:933-937.
- Jogie-Brahim S, Min HK, Fukuoka Y *et al.* Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(6):1.086-1.092.
- Johansson SGO, Bieber T, Dahl R *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:832-836.
- Kapp A, Czech W, Krutmann JSE. Eosinophil cationic protein in sera of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 555-558.
- Kim JS, O'Gorman MRG. Common *in vivo* tests for allergy and immunology. *Allergy Asthma Proc* 2004; 25: S57-8.
- Koller DY, Wojnarowski C, Herkner KR *et al.* High levels of eosinophil cationic protein in wheezing infants predict the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 752-756.
- Kurien BT, Scofield RH. Protein Blotting: a review. *J Immunol Methods* 2003; 274: 1-15.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680.
- Leonard SE, Schwartz LB. Laboratory Tests to support the clinical diagnosis of anaphylaxis. Uptodate, May 2009. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Lopata AL. Specialized *in vitro* diagnostic methods in the evaluation of hypersensitivity – an overview. *J Clin Immunol* 2006; 19(1): 18-20.



- Mello FM, Silva BG. Exames complementares para o diagnóstico das doenças alérgicas. *Alergia e imunologia na infância e adolescência*. 1 ed. Atheneu, 2001; 23-33.
- Ministério da Saúde. Testes de sensibilidade a penicilina – Manual, 1999. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- Motta AA, Oliveira AKB. Urticária e angioedema. *Clínica Médica*. 1 ed. Manole, 2009; Vol 7: 57-69.
- Nolte H. The clinical utility of basophil histamine release. *Allergy Proc* 1993; 14: 251-254.
- Nolte H, Kowal K, Dubuske L. Overview of *in vitro* allergy tests. Uptodate, May 2009. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Oppenheimer J, Nelson H. Skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96 (suppl 1): S6-S12.
- Santos KS, Kokron CM, Palma MS. Diagnóstico *in vitro*. In: Castro FFM, Jacob CMA, Moschione Castro APB *et al.* (Eds.). *Alergia alimentar*. Phadia e Ed. Tamboré: Manole, 2010.
- Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D *et al.* Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Clin Immunol* 1981; 126:1290-1294.
- Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *J Clin Immunol* 2006; 26: 451-463.
- Spalding SM, Wald V, Bernd LAG. IgE sérica total em atópicos e não atópicos na cidade de Porto Alegre. *Rev Assoc Med Bras* 2000; 46(2):93-97.
- Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK *et al.* Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 2008; 63(7):793-796.
- Tavares B. Alergia a veneno de Himenópteros, novos métodos de diagnóstico. *Acta Med Port* 2005; 18: 445-452.
- Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC *et al.* Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 367-375.
- Venge P. Serum measurements of eosinophil cationic protein (ECP) in bronchial asthma. *J Clin Exp Allergy* 1993; 23: 3-7.
- Williams P, Sewell WAC, Bunn C *et al.* Clinical immunology review series: An approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy. *Clin Exp Immunol* 2008, 153: 10-18.
- Yang AC, Pomienicki F, Castro FFM. *Alergia alimentar*. Clínica médica, 1 ed. Manole, 2009; Vol 7: 44-49.



## Seção 8 | Doenças Autoimunes





■ **Capítulo 34 | Doenças Autoimunes  
Sistêmicas, 461**



## Capítulo 34

---

# Doenças Autoimunes Sistêmicas

*Cristóvão Luis P. Manguiera*

- Introdução, 462
- Métodos de detecção, 462
- Interpretação dos testes laboratoriais em situações clínicas específicas, 465
- Referências bibliográficas, 470



## ► Introdução

Autoanticorpos podem ser definidos como imunoglobulinas que reconhecem antígenos do próprio organismo. A primeira descrição conhecida de um autoanticorpo data de 1948, por Hargraves, que relatou o fenômeno da célula LE ao associar o achado ao diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Embora classicamente a literatura médica associe à presença de autoanticorpos a ocorrência de enfermidades e síndromes clínicas de natureza autoimune, com frequência a simples demonstração do autoanticorpo não é suficiente para causar doença; em outras palavras, nem todos os autoanticorpos detectáveis por meios laboratoriais e associados estatisticamente a doenças autoimunes desempenham um papel patológico claro nessas mesmas doenças. Neste contexto, fenômenos autoimunes, antes de estarem associados a eventos patológicos, podem representar apenas uma resposta fisiológica normal, já que indivíduos saudáveis podem exibir reatividade de uma parte significativa de suas imunoglobulinas contra constituintes próprios. Esses anticorpos autorreativos fisiológicos são frequentemente denominados “autoanticorpos naturais”, e são, geralmente, de classe IgM, com baixa afinidade por seus antígenos (avidez baixa) e baixos títulos.

Por outro lado, autoanticorpos patológicos são considerados, na maior parte das situações clínicas, a pedra angular do diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. Essa importância faz com que laboratórios clínicos de referência precisem dominar diversos métodos laboratoriais que permitam a caracterização rotineira de autoanticorpos, auxiliando o clínico na árdua tarefa de diagnosticar síndromes e doenças autoimunes com precisão. Diferentemente dos autoanticorpos naturais, os autoanticorpos patológicos costumam ocorrer em títulos altos, são predominantemente da classe IgG, exibem especificidade restrita e alta afinidade por seus antígenos específicos (avidez alta) (Quadro 34.1).

Há uma lista ampla de autoanticorpos associados a doenças autoimunes sistêmicas. No Quadro 34.2 são relacionados alguns deles.<sup>1</sup>

Essas associações são, em geral, estabelecidas estatisticamente; a clara ligação fisiopatológica entre um autoanticorpo, seu antígeno-alvo e uma manifestação clínica específica ainda é exceção no campo do conhecimento em doenças autoimunes, embora muitos progressos tenham se estabelecido em anos recentes. Exceções importantes e conhecidas são, por exemplo, a demonstração do papel patogênico dos anticorpos anti-DNA (anti-DNA de fita dupla) e antinucleossomo (anticromatina) na lesão glomerular do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a associação de anticorpos anti-SS-A/Ro com bloqueio cardíaco congênito (lúpus eritematoso neonatal – LEN).

**Quadro 34.1 - Principais diferenças entre autoanticorpos naturais e patológicos.**

	Autoanticorpos naturais (fisiológicos)	Autoanticorpos patológicos
Classe	Predominantemente IgM	Predominantemente IgG
Avidez	Baixa	Alta
Título	Geralmente baixo	Geralmente alto
Especificidade	Baixa	Alta

**Quadro 34.2 - Alguns dos principais autoanticorpos de relevância clínica e sua prevalência.**

Autoanticorpo	Associação clínica	Prevalência média
Anti-dsDNA	LES, nefrite	60 a 90%
Anti-Sm	LES	30 a 35%
Antinucleossomo (anticromatina)	LES, nefrite	60 a 90%
Anti-U1-RNP	LES, DMTC	LES: 40% DMTC: 100%
Anti-SS-A/Ro	SS, LES	SS: 70% LES: 40%
Anti-SS-B/La	SS, LES	SS: 40% LES: 15%
Anti-Scl-70	Esclerose sistêmica (forma difusa)	40%
Anticentrômero	Esclerose sistêmica (forma limitada)	80%
Anti-Jo-1	Dermatomiosite/polimiosite	30%
Fator reumatoide	Artrite reumatoide	70%
Anticitrulina	Artrite reumatoide	70%
C-ANCA (antiproteínase 3)	Granulomatose de Wegener	99% (em atividade)

LES = lúpus eritematoso sistêmico; DMTC = doença mista do tecido conjuntivo; SS = síndrome de Sjögren; ANCA = anticorpos anticitoplasmas de neutrófilos.

## ► Métodos de detecção

Há diversos métodos de detecção de autoanticorpos em uso atualmente em laboratórios clínicos e de pesquisa. Essa diversidade metodológica torna difícil a comparação de resultados oriundos de diferentes laboratórios. Métodos diferentes costumam ter desempenhos diferentes, tais como diferentes especificidade e sensibilidade. As metodologias mais difundidas atualmente em laboratórios clínicos são imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação (HA), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), *immunoblots* (IB) e métodos cinéticos (nefelometria e turbidimetria).

### ■ Imunofluorescência indireta

Um dos mais antigos métodos para a detecção de autoanticorpos permanece ainda hoje como dos mais importantes; é o método de escolha para a pesquisa de anticorpos antinucleares (FAN, ANA), utilizando células HEp-2 como substrato, em substituição aos antigos substratos de tecido animal (*imprint*). A célula HEp-2 é uma linhagem celular derivada de um carcinoma laríngeo humano, e a sua padronização como substrato para a pesquisa do FAN teve impacto considerável no aumento da sensibilidade do exame para as diversas doenças autoimunes. Por exemplo, no LES, 5 a 10% dos indivíduos com a doença têm FAN negativo em *imprint* de fígado de camundongo, ao passo que este número cai para menos de 1% quando se utiliza o substrato HEp-2.

As diferenças de sensibilidade para algumas doenças autoimunes entre o substrato HEp-2 e o *imprint* de fígado de camundongo são mostradas no Quadro 34.3.

Há dezenas de padrões de fluorescência descritos em células HEp-2, mas os mais comuns são homogêneo, pontilhado, pontilhado fino, pontilhado fino denso, nucleolar e centromérico, além dos padrões citoplasmáticos (Figura 34.1).



**Quadro 34.3 - Diferenças de sensibilidade do teste de FAN realizado com substratos distintos para algumas síndromes clínicas.<sup>1</sup>**

Síndrome clínica	Frequência de positividade (%)	
	Imprint	HEp-2
LES	90 a 95	99
Esclerose sistêmica	50 a 70	95
Artrite reumatoide	30 a 50	50 a 75
Síndrome de Sjögren	50	75
Polimiosite/dermatomiosite	30	80

A definição do padrão de fluorescência tem sido associada à ocorrência de autoanticorpos específicos de maior ou menor relevância clínica. Entretanto, o FAN em HEp-2, na maioria das situações, não consegue definir com certeza qual anticorpo específico está presente no soro estudado; o padrão de fluorescência pode apenas dar uma pista da especificidade, orientando a execução posterior de um teste imunológico para detecção específica do anticorpo. Apenas em alguns casos raros (p. ex., a associação do padrão centromérico com anticorpos anticentrômeros), a correlação do padrão com o autoanticorpo tem alta especificidade. O Quadro 34.4 exemplifica algumas associações de padrões de fluorescência em HEp-2 com autoanticorpos e manifestações clínicas. Devido a essas características, a pesquisa do FAN é mais frequentemente utilizada como teste inicial (de triagem) para o diagnóstico de doenças autoimunes, reservando-se a pesquisa de autoanticorpos específicos por outros métodos laboratoriais para estudos clínicos mais refinados.

A profusão de diferentes padrões de fluorescência em HEp-2 ocorrida após a introdução desse substrato na prática laboratorial levou a uma considerável confusão na interpretação deste exame por parte de reumatologistas e outros clínicos desacostumados com a nova nomenclatura. Por outro lado, a falta de uniformização entre os laudos de diferentes laboratórios gerou dúvidas ainda maiores, fazendo com que o teste de FAN perdesse credibilidade. Para corrigir esse cenário, especialistas de todo o Brasil reúnem-se periodicamente para discutir e homogeneizar a nomenclatura do exame. Essas reuniões deram origem ao I, II e III Consensos Brasileiros de Laudos de FAN em HEp-2, atualmente a principal referência

**Quadro 34.4 - Algumas associações de padrões de fluorescência em HEp-2 com autoanticorpos e manifestações clínicas.**

Autoanticorpo	Padrão	Associações clínicas
AntidsDNA (nativo)	Homogêneo	LES
Anti-histona	Homogêneo	LES, <i>Lupus lyke syndrome</i>
Antinucleossomo	Homogêneo	LES
Anti-Sm	Pontilhado grosso	LES
Anti-U1 RNP	Pontilhado grosso	DMTC, LES
Anti-SS-A/Ro	Pontilhado fino	SS, LEN, LCS, LES
Anti-SS-B/La	Pontilhado fino	SS, LEN, LES
Antitopoisomerase I (Scl70)	Homogêneo/nucleolar	Esclerose sistêmica difusa
Anticentrômero	Centromérico	Esclerose sistêmica limitada
Anti-PCNA	Nuclear pleomórfico	LES

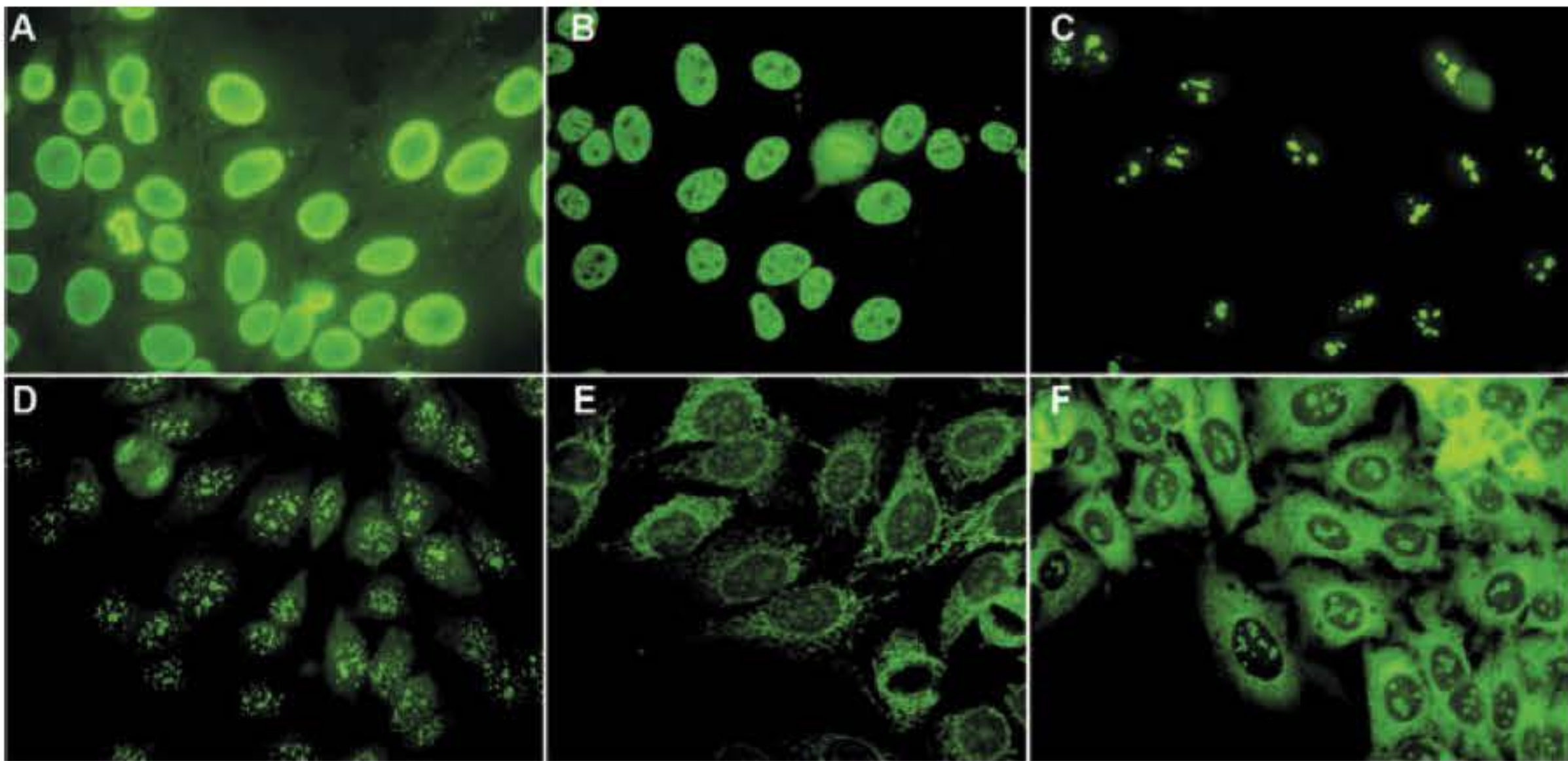
LES = lúpus eritematoso sistêmico; DMTC = doença mista do tecido conjuntivo; SS = síndrome de Sjögren; LEN = lúpus eritematoso neonatal; LCS = lúpus cutâneo subagudo.

brasileira na execução e relato do teste.<sup>2</sup> O Consenso Brasileiro recomenda que os laudos sejam sempre relatados de maneira “descritiva”, ou seja, definindo a positividade ou negatividade das principais estruturas celulares (núcleo, nucléolo, citoplasma, aparelho mitótico e placa metafásica cromossômica), além de título e padrão de fluorescência. A adoção da nomenclatura do Consenso Brasileiro é fundamental para a comparabilidade interlaboratorial dos resultados e para facilitar a interpretação clínica do teste.

A imunofluorescência indireta pode ainda ser utilizada para a detecção de alguns autoanticorpos especificamente, como o antidsDNA (utilizando o protozoário flagelado *Crithidia luciliae* como substrato), ou anticorpos antimitocôndria, anti-músculo liso ou antimicrosossomiais (utilizando cortes de tecidos animais como substrato).

▪ **Hemaglutinação e ELISA**

São hoje os métodos mais utilizados para a detecção de autoanticorpos específicos (com especificidade antigênica única). Os ELISA têm a vantagem de serem mais reprodutivos e mais sensíveis que a hemaglutinação, além de eliminarem



**Figura 34.1** Alguns padrões de fluorescência em HEp-2. **A.** Nuclear homogêneo (antidsDNA). **B.** Nuclear pontilhado grosso (anti-Sm). **C.** Nucleolar. **D.** Centromérico (anticentrômero). **E.** Citoplasmático reticular (antimitocôndria). **F.** Citoplasmático pontilhado fino + nucleolar.



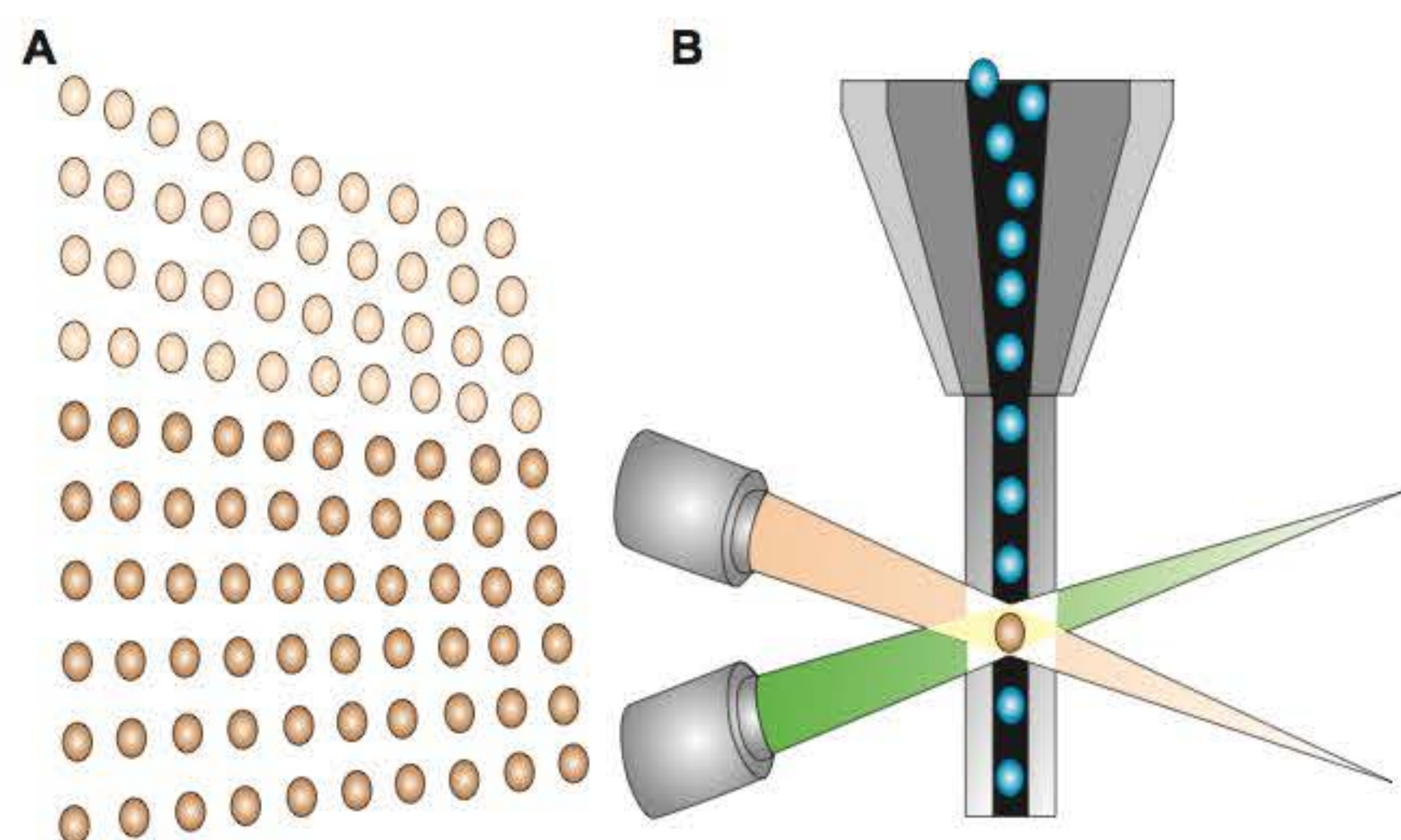
a subjetividade da leitura. A hemaglutinação sobrevive em alguns laboratórios apenas por ter um custo inferior aos testes ELISA.

A introdução do ELISA no laboratório de autoimunidade tornou rara a utilização de outros métodos para a detecção de autoanticorpos específicos, principalmente devido à versatilidade do método para ser incorporado a sistemas de automação laboratorial. Os métodos de ELISA tradicionais (em microplacas plásticas) podem ser substituídos com vantagem por aparelhos automatizados que utilizem variações da técnica, como quimioluminescência e imunofluorimetria.

Os laboratórios clínicos dispõem hoje de *kits* comerciais de ELISA para a detecção da maioria dos autoanticorpos de relevância clínica conhecidos. Mais modernamente, os métodos imunoenzimáticos são projetados de modo a fornecer resultados quantitativos, o que pode auxiliar o clínico a definir a associação dos achados com doença autoimune, já que títulos mais altos de autoanticorpos, de modo geral, estão mais fortemente associados a estados de doença. Atualmente, os ELISA são métodos de razoável confiabilidade para a detecção específica de autoanticorpos. Entretanto, ainda permanecem diferenças de desempenho entre eles e os métodos originais, em que a maior parte dos autoanticorpos foi descrita pela primeira vez (*immunoblots* e imunodifusão); estas diferenças podem levar, eventualmente, a resultados divergentes, principalmente quando comparamos resultados de laboratórios clínicos com laboratórios de referência em pesquisa. De maneira geral, os ELISA são mais sensíveis e um pouco menos específicos que os métodos de referência.

### ▪ Ensaios multiplex | Plataforma Luminex®

A plataforma Luminex® foi desenvolvida recentemente como uma alternativa aos métodos de ELISA para a detecção de autoanticorpos específicos e mesmo como substituta dos métodos de triagem em IFI. Trata-se de uma tecnologia inovadora, na qual 100 *beads* fluorescentes de cores diferentes podem ser marcadas com diferentes antígenos, correspondendo cada cor a um antígeno específico. Após incubação com a amostra biológica, um segundo anticorpo, conjugado a um fluorocromo, liga-se especificamente ao anticorpo procurado; a leitura é feita por meio de excitação luminosa com dois feixes de *laser*, dos quais um reconhece a cor da *bead* e outro, a do fluorocromo. A interpretação dos dados é realizada à semelhança dos contadores hematológicos por citometria de fluxo, contando-se “eventos” em *gates* específicos (Figura 34.2).



**Figura 34.2** Representação esquemática do imunoensaio multiplex (Luminex®).

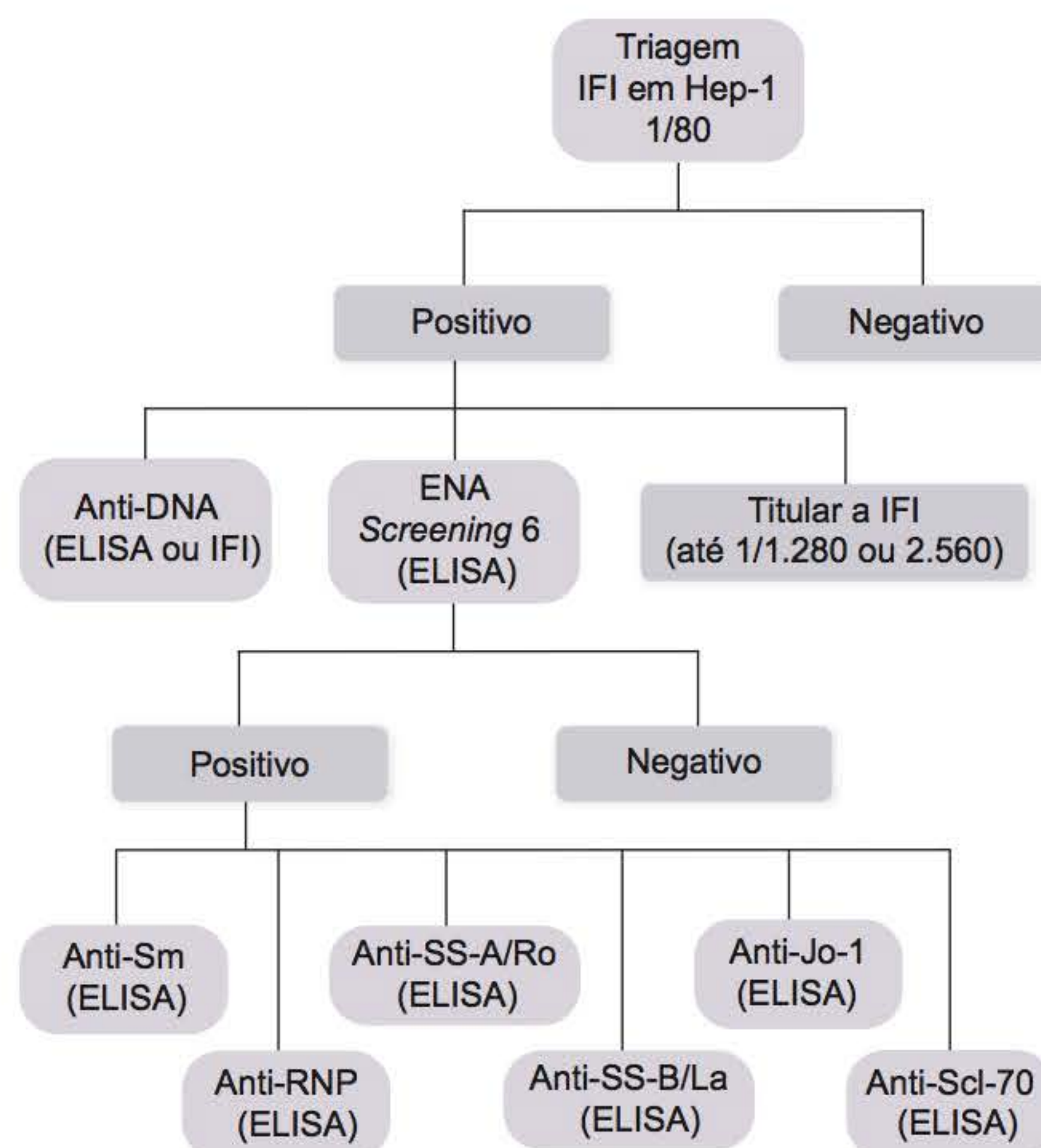
### Quadro 34.5 - Aplicação dos métodos laboratoriais na pesquisa de autoanticorpos.

Método	Aplicação
IFI em HEp-2, <i>imprint</i>	Triagem de autoanticorpos (FAN, ANA)
IFI com substratos específicos (p. ex., <i>C. luciliae</i> )	Deteção de autoanticorpos específicos
ELISA, hemaglutinação, quimioluminescência, imunofluorimetria	Deteção de autoanticorpos específicos
Imunoensaio Multiplex (Luminex®)	Deteção de autoanticorpos específicos Triagem de autoanticorpos

O método Luminex® tem se mostrado uma excelente alternativa aos ELISA e suas variantes na detecção e quantificação de autoanticorpos específicos, apresentando desempenho superior em várias situações; entretanto, seu uso na triagem de autoanticorpos, em substituição à IFI em HEp-2, ainda não fornece resultados comparáveis.

A aplicação dos métodos laboratoriais mais comuns na pesquisa e quantificação de autoanticorpos é resumida no Quadro 34.5.

Em alguns serviços universitários, são adotados algoritmos de pesquisa de autoanticorpos que levam em conta testes de triagem por IFI (FAN em HEp-2) e por ELISA (ENA *screening*) que, quando positivos, originam automaticamente a pesquisa de autoanticorpos de especificidades definidas por ELISA ou outro método. Um exemplo disso é o algoritmo adotado por alguns anos no Laboratório Central do HCFMUSP (Figura 34.3).



**Figura 34.3** Exemplo de algoritmo laboratorial para pesquisa de anticorpos antinucleares.



## ► Interpretação dos testes laboratoriais em situações clínicas específicas

### ▪ Lúpus eritematoso sistêmico

Anticorpos antinucleares ocorrem em mais de 98% dos indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico, quando pesquisados por imunofluorescência indireta utilizando-se células HEp-2 como substrato. As especificidades de maior utilidade clínica na doença são antidsDNA e antinucleossomo. Outros autoanticorpos também podem ser úteis, como o anti-RNP ribossomal, anti-PCNA, anti-U1 RNP, anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La. As principais associações clínicas de autoanticorpos no LES encontram-se resumidas no Quadro 34.6.

Anticorpos antidsDNA (anti-DNA de dupla hélice) são, talvez, a mais importante ferramenta diagnóstica laboratorial para o LES. Estão diretamente envolvidos na patogênese da doença renal, por meio da deposição de imunocomplexos na membrana basal glomerular. Como participam da patogênese, seus níveis séricos podem ser utilizados para acompanhamento do grau de atividade da doença renal, em conjunto com os níveis de complemento sérico;<sup>1</sup> níveis altos de antidsDNA são encontrados em pacientes lúpicos com doença renal ativa, e estes níveis tendem a cair em resposta ao tratamento imunossupressor eficaz. Isso nos leva a preferir métodos laboratoriais quantitativos, em detrimento dos qualitativos, para pesquisa dos anticorpos antidsDNA. Anticorpos antidsDNA guardam ainda alta especificidade diagnóstica para o lúpus, especialmente quando em altos títulos.

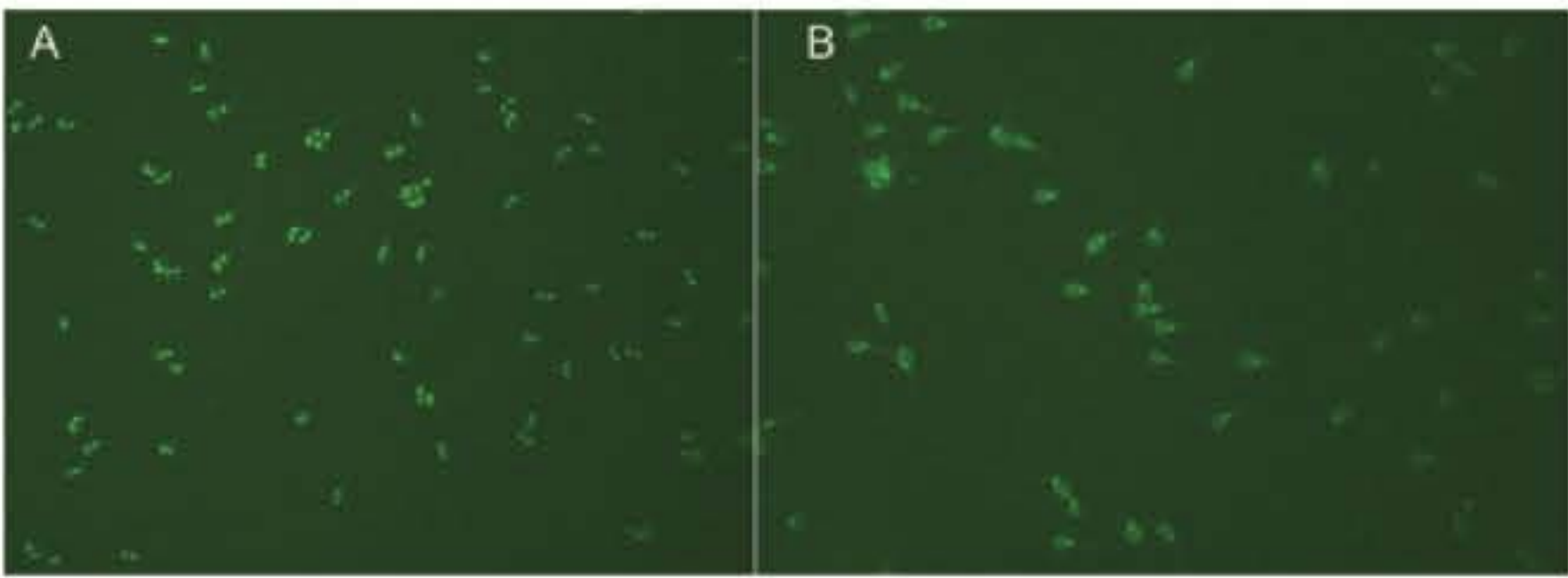
Os dois métodos mais utilizados para a pesquisa de antidsDNA em laboratórios clínicos são a IFI utilizando como substrato um protozoário flagelado, a *Crithidia luciliae*, e o ELISA. O critério de positividade da IFI consiste na observação de fluorescência em uma organela situada na base do flagelo, o cinetoplasto, e baseia-se na reação cruzada entre anticorpos antidsDNA humanos e DNA mitocondrial de *Crithidia* (Figura 34.4). Apesar de extremamente específica, a IFI em *C. luciliae* é uma metodologia trabalhosa e de interpretação (leitura microscópica) subjetiva, além de ser apenas semiquantitativa e de baixa sensibilidade.

A principal alternativa metodológica para a pesquisa de antidsDNA é o ELISA quantitativo, muito mais sensível, mas de especificidade mais baixa que a IFI.

**Quadro 34.6 - Principais associações clínicas de autoanticorpos no LES.**

Autoanticorpo	Frequência (%)	Especificidade	Associação clínica
dsDNA (nativo)	60 a 90	Alta	Nefrite, atividade de doença
Nucleossomo	60 a 90	Alta	Nefrite, atividade de doença
Histona	90	Baixa	<i>Lupus lyke syndrome</i>
SS-A/Ro	20 a 60	Baixa	LEN, LCS
SS-B/La	20 a 60	Baixa	—
Sm	15 a 35	Alta	—
RNP ribossomal	10 a 15	Alta	Lúpus psiquiátrico
PCNA	5	Alta	—
Cardiolipina	10 a 35	Baixa	SAF

LEN = lúpus eritematoso neonatal; LCS = lúpus cutâneo subagudo; SAF = síndrome do anticorpo antifosfolípido.



**Figura 34.4** Imunofluorescência indireta em *C. luciliae* para pesquisa de antidsDNA. **A.** Teste positivo; **B.** teste negativo.

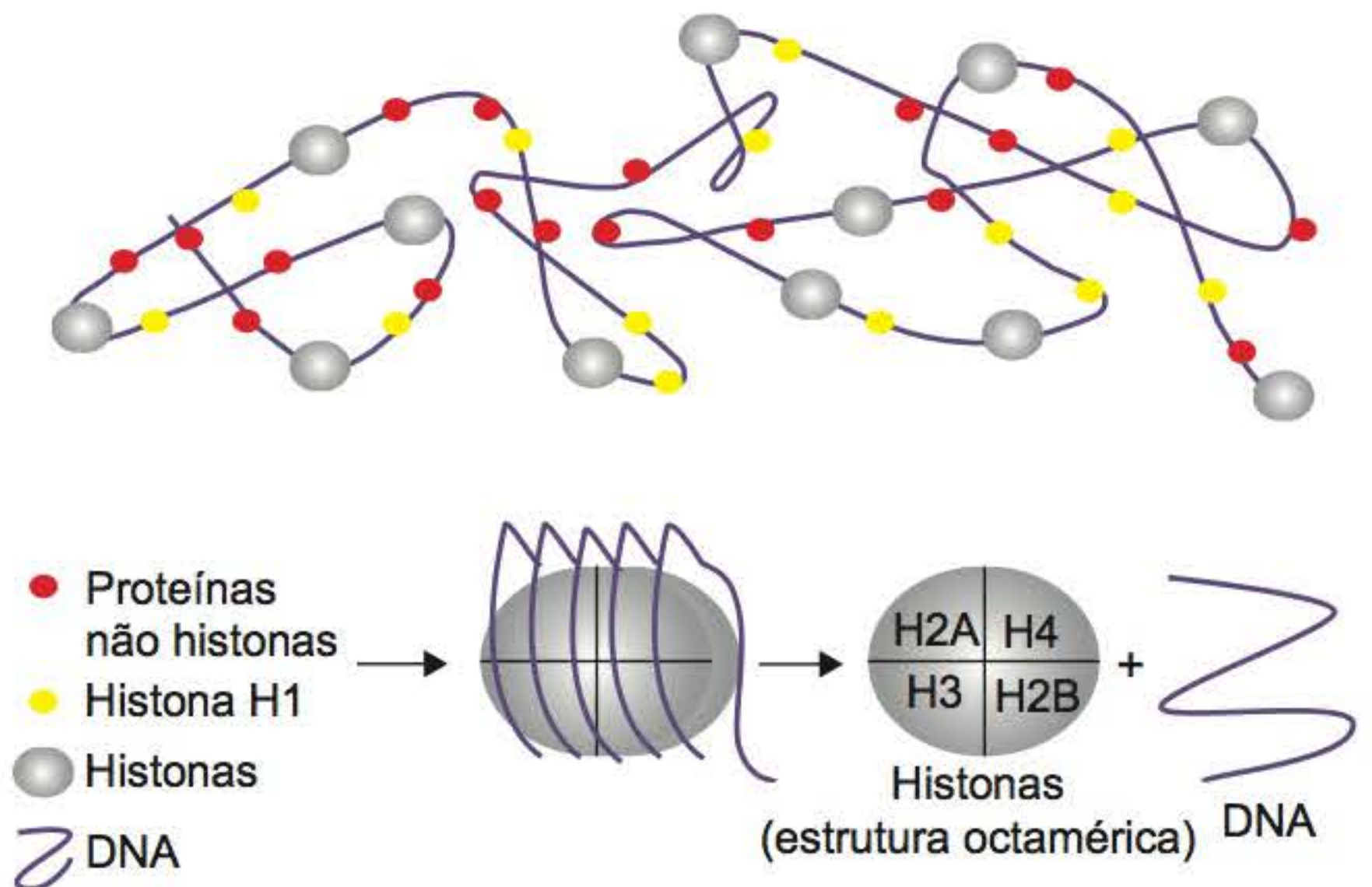
Anticorpos anticromatina (antinucleossomo) estão associados fortemente ao diagnóstico de LES, com alta especificidade e associação com lesão renal, à semelhança do que ocorre com os anticorpos antidsDNA. Nucleossomos são unidades estruturais complexas da cromatina, constituídas por um octâmero de histonas (dos tipos H2A, H2B, H3 e H4) enovelado por uma fita de dsDNA na qual se aderem histonas do tipo H1 e algumas proteínas não histona (Figura 34.5). Várias evidências científicas oriundas de modelos experimentais, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm demonstrado que os imunocomplexos nucleossomo/antinucleossomo desempenham um papel central na fisiopatogênese da lesão glomerular do LES. A detecção quantitativa de anticorpos antinucleossomo por ELISA tem se consolidado como um dos testes mais confiáveis para o diagnóstico do LES, bem como para o acompanhamento de atividade da lesão renal e da resposta ao tratamento.<sup>3</sup> No LES, a sensibilidade do exame varia de 50 a 86% e a especificidade média está acima de 95%.

Presentes em cerca de 30 a 35% dos pacientes com LES, os anticorpos anti-Sm são marcadores de alta especificidade para a doença.<sup>4</sup> Entretanto, ao contrário dos anticorpos antidsDNA, não são marcadores de lesão em nenhum órgão específico e não sofrem variação como reflexo de atividade da doença.

Anticorpos anti-P ribossomal são encontrados em 10 a 15% dos pacientes com LES, tendo alta especificidade para a doença. Parecem estar associados a manifestações clínicas neuropsiquiátricas.<sup>5</sup>

Anticorpos anti-U1 RNP podem ocorrer em indivíduos com LES em associação com anticorpos anti-Sm. Quando aparecem isoladamente, e em altos títulos, associam-se à doença mista do tecido conjuntivo (DMTC).

Apesar de extremamente raros (3 a 5% dos pacientes), os anticorpos anti-PCNA (antígeno nuclear de células em proliferação) são altamente específicos para o diagnóstico do LES<sup>6</sup>



**Figura 34.5** Estrutura molecular dos nucleossomos.



e se associam ao padrão de fluorescência nuclear pleomórfico em células HEp-2.

Anticorpos anti-SS-A/Ro e SS-B/La também podem ser encontrados em indivíduos com LES, mas não têm especificidade diagnóstica. Ambos podem também estar associados à síndrome de Sjögren (síndrome *sicca*).<sup>7</sup> Anticorpos anti-SS-A/Ro, no LES, associam-se a lesões cutâneas características denominadas lúpus cutâneo subagudo, uma dermatite fotossensível geralmente refratária ao tratamento convencional.<sup>8</sup>

Por último, mas não menos importante, anticorpos anti-SS-A/Ro podem associar-se a uma síndrome clínica conhecida como lúpus eritematoso neonatal, uma síndrome congênita composta por artrite, lesões cutâneas, e, em cerca de 50% dos casos, bloqueio atrioventricular congênito, a única manifestação irreversível da síndrome. Os outros sinais clínicos tendem a desaparecer após seis meses do nascimento, período em que as imunoglobulinas maternas são depuradas do organismo da criança.<sup>9</sup> O LEN está associado à passagem transplacentária de anticorpos anti-SS-A/Ro da mãe para o feto e pode ocorrer tanto em gestantes com LES como com síndrome de Sjögren.

### ▪ Síndrome de Sjögren

A síndrome de Sjögren pode ser definida como uma “exocrinopatia autoimune”, condição clínica em que há destruição inflamatória necrótica de glândulas exócrinas em geral, com especial predileção por glândulas lacrimais e salivares. Na SS, as principais manifestações clínicas estão associadas à hipofunção desses dois grupos de glândulas, predominando queixas de xerostomia (boca seca e dificuldade de ingerir alimentos sólidos) e xeroftalmia (olhos secos e complicações associadas, como ceratoconjuntivite e úlceras de córnea). A enfermidade é relativamente comum, embora frequentemente subdiagnosticada; em geral tem natureza benigna, bastando ser tratada com medidas paliativas (colírios e estimuladores artificiais de saliva); entretanto, raramente pode ser acompanhada por uma pneumopatia intersticial potencialmente fatal, que requeira imunossupressão. Outra rara complicação é o comprometimento da porção exócrina do pâncreas, que leva a quadros de pancreatite aguda.

A avaliação laboratorial da SS está ancorada na detecção de três autoanticorpos de alta prevalência na doença, embora nenhum deles tenha especificidade: anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La e fator reumatoide<sup>7</sup> (Quadro 34.7).

Além da história clínica característica e dos autoanticorpos, podem auxiliar o diagnóstico de SS dois testes oftalmológicos que definem a presença de “olho seco”, o teste de Shirmer (medida da difusão da lágrima em um papel de filtro, em milímetros) e o teste de rosa bengala (impregnação da esclerótica ressecada com o corante de rosa bengala). Eventualmente, pode ser necessária a realização de biopsia de glândula salivar

#### Quadro 34.7 - Autoanticorpos na síndrome de Sjögren.

Autoanticorpo	Frequência (%)	Especificidade
Anti-SS-A/Ro	60 a 90	Baixa
Anti-SS-B/La	20 a 60	Baixa
Fator reumatoide	90	Baixa

#### Quadro 34.8 - Diagnóstico da síndrome de Sjögren.

História clínica	Xerostomia e xeroftalmia
Autoanticorpos	SS-A Ro, SS-B/La e FR
Testes oftalmológicos	Shirmer e rosa bengala
Biopsia de glândula salivar	Infiltrado inflamatório necrótico

menor para demonstração histopatológica de infiltrado inflamatório necrótico característico (Quadro 34.8).

### ▪ Esclerose sistêmica (esclerodermia)

A esclerose sistêmica é uma doença generalizada do tecido conjuntivo que afeta pele e órgãos internos, caracterizada histopatologicamente por arteriosclerose fibrótica da vasculatura periférica e visceral e grau variável de deposição de matriz extracelular (principalmente colágeno) tanto na pele como nas vísceras. Há dois autoanticorpos com maior utilidade clínica na esclerose sistêmica: anticentrômero e antitopoisomerase I (Scl-70).

Anticorpos anticentrômero estão associados à forma limitada da doença (comprometimento cutâneo restrito à face e às extremidades e baixa ocorrência de fibrose pulmonar), uma forma anteriormente conhecida por síndrome CREST. Ocorrem em cerca de 80% dos pacientes com esta forma clínica<sup>10</sup> (Quadro 34.9).

Anticorpos antitopoisomerase I (Scl-70) estão associados à forma difusa da esclerose sistêmica, com comprometimento cutâneo em todo o corpo e maior ocorrência de fibrose pulmonar. São encontrados em até 40% dos pacientes com esta forma clínica.<sup>11</sup>

Na pesquisa do FAN por imunofluorescência indireta em células HEp-2, anticorpos anticentrômero podem ser observados como um padrão de fluorescência centromérico, uma associação de alta especificidade, ao passo que anticorpos antitopoisomerase I costumam associar-se a um padrão homogêneo/nucleolar de fluorescência.

Um terceiro grupo de autoanticorpos vem ganhando maior relevância clínica no diagnóstico de esclerose sistêmica, os anticorpos anti-RNA polimerase III; estes anticorpos ocorrem em 10 a 15% de todos os pacientes, mas em até 45% na forma difusa, com alta especificidade.

#### Quadro 34.9 - Associações clínicas dos principais autoanticorpos na esclerose sistêmica.

Autoanticorpo	Padrão em HEp-2	Frequência (%)	Especificidade	Associação clínica
Topoisomerase I (Scl-70)	Homogêneo/nucleolar	40 (difusa)	Alta	Forma sistêmica difusa
Centrômero	Centromérico	80 (limitada)	Média	Forma sistêmica limitada (síndrome “CREST”)
RNA polimerase III	Nuclear pontilhado/nucleolar	45 (difusa)	Alta	Forma sistêmica difusa



▪ **Doença muscular inflamatória autoimune (polimiosite/dermatomiosite)**

Denomina-se genericamente como doença muscular inflamatória autoimune uma enfermidade caracterizada por inflamação crônica da musculatura estriada (polimiosite) que leva à fraqueza muscular proximal progressiva, às vezes associada a um quadro cutâneo característico (dermatomiosite). Associações com autoanticorpos específicos podem definir subgrupos de indivíduos clinicamente homogêneos dentro da doença.

Na polimiosite/dermatomiosite (DM/PM), mais de 80% dos pacientes têm autoanticorpos contra antígenos nucleares e/ou citoplasmáticos (FAN positivo)<sup>12</sup> e aproximadamente metade deles tem anticorpos miosite-específicos.<sup>13</sup>

O autoanticorpo mais frequentemente identificado na doença, anti-Jo-1, é encontrado em apenas 20% de todos os pacientes com miosite.<sup>14</sup> Anti-Jo-1 é o anticorpo mais comum de um grande grupo de autoanticorpos, os antiaminoacil-tRNA sintetases, ou, mais simplesmente, antissintetases. Especificamente, o anti-Jo-1 é a anti-histidil-tRNA sintetase. Pacientes com antissintetases costumam apresentar sintomas clássicos de polimiosite (fraqueza muscular proximal progressiva) e mais raramente de dermatomiosite, além da chamada “síndrome antissintetase”, caracterizada por febre, poliartrite inflamatória eventualmente deformante, fenômeno de Raynaud e doença pulmonar intersticial.<sup>15</sup> Em células HEp-2, anticorpos anti-Jo-1 costumam determinar um padrão citoplasmático pontilhado de fluorescência.

Anticorpos anti-Mi-2 ocorrem em 5 a 10% dos pacientes e estão fortemente associados às lesões cutâneas da dermatomiosite: lesões eritematovioláceas nas pálpebras (heliótropo) e na pele justarticular (pápulas de Gottron).<sup>16</sup> Crianças com dermatomiosite podem apresentar anticorpos anti-Mi-2 em cerca de 10% dos casos.<sup>17</sup> Pacientes com anti-Mi-2 não têm as associações clínicas descritas para a “síndrome antissintetase” e costumam ter boa resposta ao tratamento, exceto pelas lesões cutâneas.

Anticorpos antipartícula reconhecadora de sinal (anti-SRP) são marcadores de um subgrupo de pacientes com doença muscular especialmente grave, geralmente sem doença cutânea e com complicações cardíacas em ocorrência maior do que o esperado.<sup>18</sup>

Os raros autoanticorpos anti-PM/Scl estão geralmente associados à síndrome de superposição polimiosite/esclerose sistêmica.

Um resumo das informações sobre autoanticorpos na polimiosite/dermatomiosite é apresentado no Quadro 34.10.

▪ **Doença mista do tecido conjuntivo**

A doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) é uma síndrome clínica individualizada do LES identificada em 1972, por Sharp *et al.*, com características clínicas de superposição de sinais e sintomas de LES, esclerodermia e miopatias inflamatórias, mas cujas manifestações mais marcantes são a ocorrência de fenômeno de Raynaud, hipomotilidade esofágica e edema das falanges proximais das mãos (“dedos em salsicha”); por definição, todos os pacientes com DMTC exibem altos títulos de anticorpos anti-U1-RNP. Outros autoanticorpos, como anti-Ku e mesmo antinucleossomo, podem ser ocasionalmente observados.

▪ **Vasculites sistêmicas**

Vasculites são enfermidades nas quais o sistema vascular é o alvo primário da agressão, de substrato histopatológico inflamatório e, geralmente, associadas a evidências de mecanismos patogênicos autoimunes. Trata-se de um grupo heterogêneo de síndromes clínicas, tradicionalmente agrupadas em relação ao calibre dos vasos predominantemente acometidos. Dentre as chamadas vasculites de pequenos vasos, a granulomatose de Wegener (GW) e a poliarterite microscópica (PAM) estão fortemente associadas a um grupo de autoanticorpos denominados anticitoplasma de neutrófilos (ANCA).

Quadro 34.10 ▪ Autoanticorpos na dermatomiosite/polimiosite (DM/PM).				
Autoanticorpo	Antígeno	Frequência (%)	Especificidade	Associação clínica na DM/PM
Jo-1	Histidil-tRNA sintetase	18-20	Alta	Síndrome antissintetase
PL7	Treonil-tRNA sintetase	< 3	Alta	Síndrome antissintetase
PL12	Alanil-tRNA sintetase	< 3	Alta	Síndrome antissintetase
OJ	Isoleucil-tRNA sintetase	< 2	Alta	Síndrome antissintetase
EJ	Glicil-tRNA sintetase	< 2	Alta	Síndrome antissintetase
KS	Asparaginil-tRNA sintetase	< 2	Alta	Síndrome antissintetase
SRP	Proteína reconhecadora de sinal	4-6	Alta	Polimiosite grave
Mi-2	NuRD helicase Mi2α Mi2β	5-14	Alta	Dermatomiosite
PM/Scl	Exossomo	5-10	Alta	Superposição esclerodermia/polimiosite
SS-A/Ro	SS-A RNP	31	Baixa	-
		14	Baixa	-
Ku	Proteinoquinase DNA dependente	23	Baixa	-
U1RNP	U1RNP	15	Baixa	-
Scl-70	Topoisomerase I	3	Baixa	-
RNA Pol III	RNA polimerase III	2	Baixa	-
Centrômero	Centrômero	2	Baixa	-



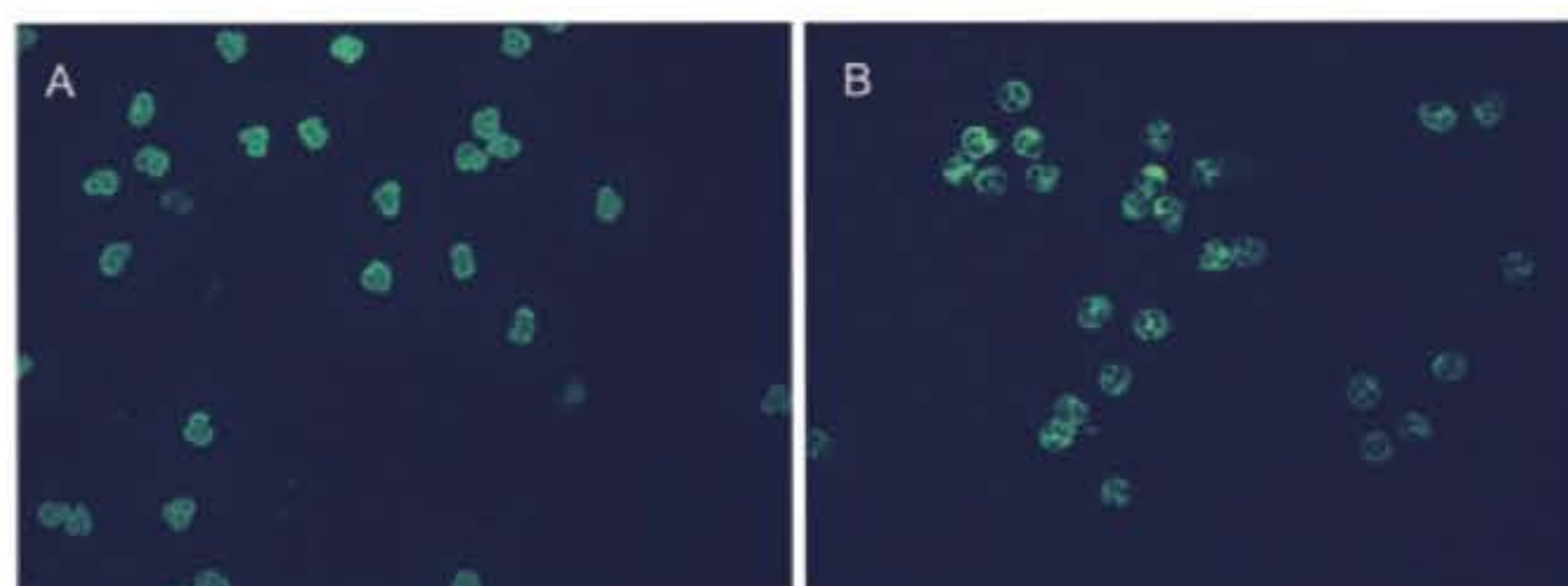
ANCA são autoanticorpos de especificidades variáveis, dirigidos contra os grânulos citoplasmáticos neutrofílicos. À semelhança do FAN, são preferencialmente pesquisados por métodos de imunofluorescência indireta, neste caso utilizando como substrato neutrófilos humanos fixados em lâminas de vidro com etanol. Os padrões de fluorescência clássicos são dois: citoplasmático (C-ANCA) e perinuclear (P-ANCA) (Figura 34.6); padrões que não se encaixam em nenhum dos dois classicamente descritos são denominados atípicos (A-ANCA ou X-ANCA). Além disso, é cada vez mais comum o uso de métodos imunoenzimáticos (ELISA) para a pesquisa e quantificação de autoanticorpos específicos do sistema ANCA.<sup>19</sup>

Embora já tenham sido descritos mais de uma dezena de antígenos relacionados aos ANCA, dois deles têm especial relevância clínica: anticorpos antiproteínase-3 (anti-PR3), com padrão de fluorescência C-ANCA, e sua associação ao diagnóstico de GW e anticorpos antimieloperoxidase (anti-MPO), com padrão de fluorescência P-ANCA e sua associação com PAM.

Anticorpos anti-PR3, com padrão C-ANCA de fluorescência, ocorrem em até 99% dos pacientes com GW, quando pesquisados na doença ativa. Em pacientes tratados ou fora de atividade, essa prevalência pode cair para cerca de 30%. Por outro lado, a especificidade de um padrão C-ANCA de fluorescência para o diagnóstico de GW pode chegar a 98%. Aparentemente, os títulos de C-ANCA (e de anti-PR3 por ELISA) tendem a variar com a atividade da doença e podem ser usados para acompanhar a resposta ao tratamento imunossupressor.<sup>20</sup>

Anticorpos anti-MPO, com padrão P-ANCA de fluorescência, ocorrem em até 80% dos pacientes com PAM e têm razoável especificidade para a doença.<sup>21</sup>

Os padrões de fluorescência observados em lâminas fixadas com etanol não correspondem à localização observada para os antígenos relacionados ao ANCA *in vivo*. Em vez disso, trata-se de artefatos técnicos associados a diferenças de cargas elétricas entre os diversos grânulos neutrofílicos, o que define sua maior ou menor aproximação do núcleo celular, com carga elétrica negativa. Assim, o antígeno PR3, uma proteína neutra, tende a permanecer disperso no citoplasma, enquanto o antígeno MPO e a maioria dos outros grânulos neutrofílicos, fortemente catiônicos, tende a aproximar-se artificialmente do núcleo. Isso explica por que, em geral, apenas pacientes com anticorpos anti-PR3 têm padrão C-ANCA, ao passo que pacientes com anticorpos anti-MPO ou outros têm padrão P-ANCA de fluorescência (Quadro 34.11). Esse artefato técnico é observado apenas em lâminas fixadas com etanol. Tal fato tem levado à estratégia de alguns laboratórios de utilizar lâminas com outros fixadores, como a formalina, na diferenciação de anticorpos contra grânulos neutrofílicos catiônicos (P-ANCA verdadeiros) de anticorpos antinucleares (FAN)



**Figura 34.6** Padrões de fluorescência em etanol de anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA). **A.** C-ANCA. **B.** P-ANCA.

#### Quadro 34.11 • Especificidades antigênicas e padrões de fluorescência no sistema ANCA.

Autoanticorpo	Padrão de fluorescência em etanol
Proteínase 3 (PR3)	C-ANCA; muito raramente atípico
Mieloperoxidase (MPO)	P-ANCA; muito raramente atípico
Elastase	P-ANCA
Catepsina G	P-ANCA
Azurocidina	P-ANCA
Lactoferrina	P-ANCA
Lisozima	P-ANCA; atípico
BPI	C-ANCA, P-ANCA ou atípico

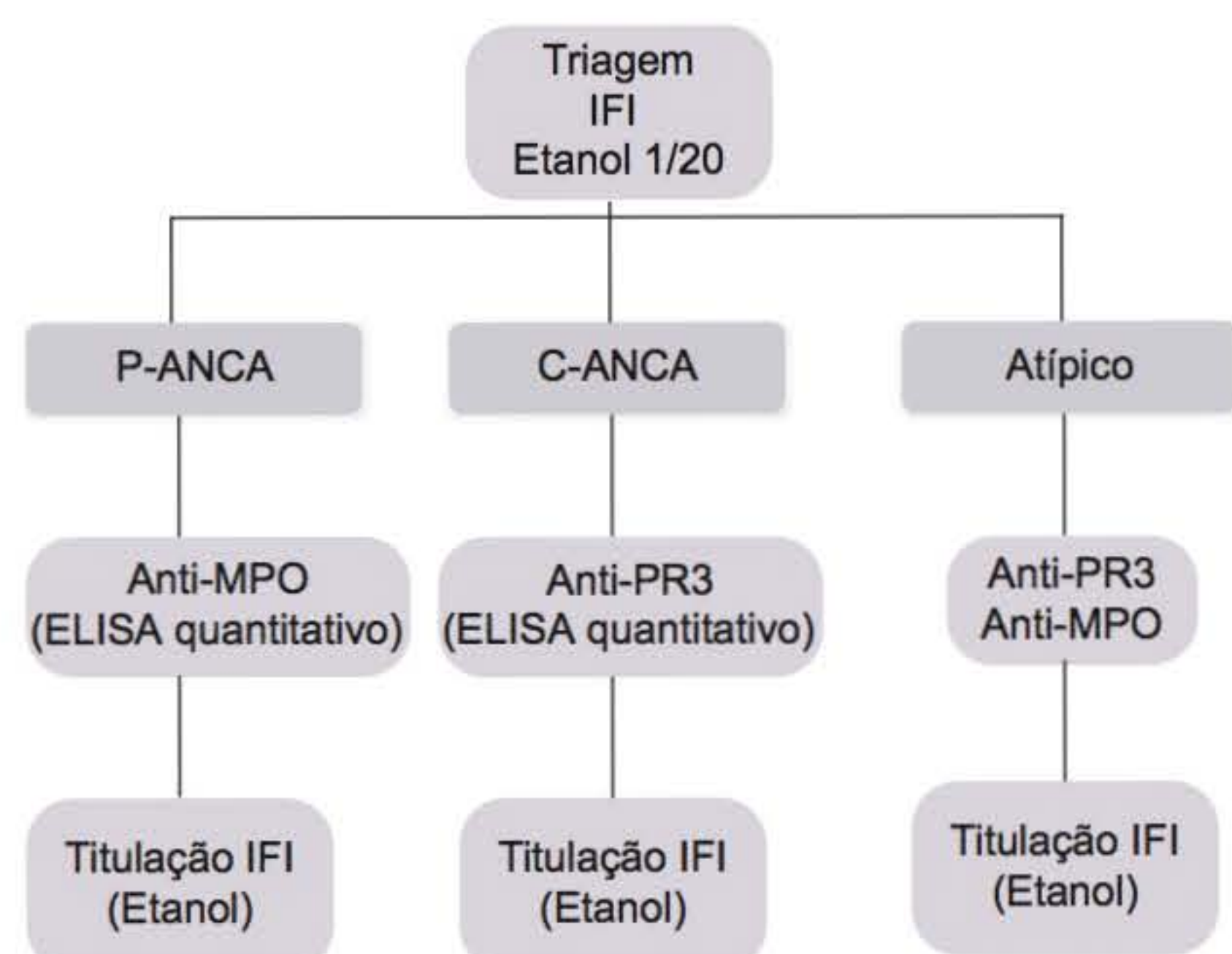
que, quando presentes, podem dificultar muito a interpretação microscópica da fluorescência sugestiva de P-ANCA.

Como ocorre na pesquisa de anticorpos antinucleares em serviços universitários e de referência, a pesquisa de ANCA em ambientes acadêmicos costuma ser direcionada por algoritmos diagnósticos que levam em conta testes de triagem por imunofluorescência (com lâminas fixadas em etanol) que, quando positivos, provocam automaticamente a realização de testes complementares (IFI em formalina e ELISA anti-PR3 e anti-MPO) (Figura 34.7).

### Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica multissistêmica, reconhecida como a mais comum das artrites inflamatórias. A principal morbidade da doença está associada ao acometimento de articulações diartrodiais, que resulta em grande disfunção e deformidade articulares, embora se observe comumente o envolvimento de vários outros órgãos, em maior ou menor grau.

A demonstração laboratorial de fatores reumatóides (autoanticorpos de classe IgM, IgG ou IgA dirigidos contra a porção Fc da molécula de IgG) é, há décadas, associada ao diagnóstico de AR. Os fatores reumatóides (FR) são encontrados em cerca de 80% dos pacientes com AR, e a sua ocorrência parece estar associada a pior prognóstico articular, presença de nódulos reumatóides, maior frequência de erosões e manifestações extra-articulares.<sup>22</sup> Este valor prognóstico parece



**Figura 34.7** Algoritmo diagnóstico para pesquisa de ANCA.



não ser dependente da classe de imunoglobulina predominante. Entretanto, o valor diagnóstico dos fatores reumatóides é limitado por sua baixa especificidade para a doença, já que podem ser detectados em condições clínicas tão díspares como síndrome de Sjögren (cerca de 90% dos casos), endocardite bacteriana (até 50%), hanseníase (até 25%), neoplasias, crioglobulinemia, sarcoidose ou mesmo em indivíduos idosos saudáveis.

Os ensaios de aglutinação com partículas de látex e com hemácias de carneiro sensibilizadas (ensaio de Waaler-Rose) têm sido tradicionalmente utilizados para a pesquisa dos fatores reumatóides. Atualmente, os métodos cinéticos (nefelometria e turbidimetria) automatizados têm substituído largamente os métodos tradicionais, por serem consideravelmente mais sensíveis, rápidos e reprodutíveis. Os ELISA são preferíveis quando se faz necessário determinar a classe do fator reumatoide (IgG, IgA ou IgM).

Mais recentemente, ensaios capazes de detectar autoanticorpos que reconhecem um epitopo da molécula de filagrina, o aminoácido citrulina, têm demonstrado alta especificidade para o diagnóstico da AR, em particular um ensaio imunoenzimático que detecta anticorpos dirigidos contra um peptídeo cíclico citrulinado sintético (anti-CCP).<sup>23-25</sup> Vários estudos definiram um alto valor diagnóstico para os anticorpos anticitrulina (anti-CCP) e sugerem o seu uso em conjunto com a pesquisa do fator reumatoide na prática clínica. Entretanto, as relações dos níveis de anti-CCP com outros parâmetros clínicos e laboratoriais na AR ainda não foram bem definidas.

O advento dos anticorpos anticitrulina (anti-CCP) na prática clínica, nos primeiros anos do século 21, revolucionou o diagnóstico laboratorial da AR, a ponto de suplantarem os tradicionais fatores reumatóides em importância diagnóstica e serem incluídos, mais tarde, nos critérios de classificação da doença do American College of Rheumatology (ACR). Entretanto, a convivência dos novos ensaios de anticitrulina com os velhos FR e a frequente discordância de resultados entre os exames trouxe novos dilemas diagnósticos ao clínico e ao laboratório. Em uma tentativa de auxiliar a interpretação desses exames, propõe-se um algoritmo diagnóstico prático, demonstrado no Quadro 34.12.

## ▪ Artrites idiopáticas juvenis

O grupo de doenças denominado artrites idiopáticas juvenis (AIJ), ou, anteriormente, artrite reumatoide juvenil, cons-

**Quadro 34.12 ▪ Algoritmo sugerido para a interpretação do padrão de autoanticorpos na artrite reumatoide (AR).**

Fator reumatoide	Anticitrulina (anti-CCP)	Probabilidade de AR
IgM+, IgA+, IgG+	+	Quase certeza
IgM+, IgA+, IgG+	–	Quase certeza
IgM+, IgA+, IgG–	+	Quase certeza
IgM+, IgA+, IgG–	–	Provável
IgM+, IgA–, IgG–	+	Muito provável
IgM+, IgA–, IgG–	–	Baixa probabilidade
IgM–, IgA–, IgG–	+	Muito provável

titui-se em uma associação heterogênea de ao menos seis síndromes clínicas distintas, que têm em comum a característica de serem doenças inflamatórias sistêmicas com algum grau de acometimento articular.

A diferenciação das várias síndromes é em geral ancorada na forma de início do comprometimento articular, mas leva em conta diversas outras características clínicas e ao menos dois testes laboratoriais: a pesquisa de anticorpos antinucleares (FAN) e dos fatores reumatóides (Quadro 34.13).

Anticorpos antinucleares ocorrem em cerca de 40% das crianças com AIJ<sup>26</sup> e estão consistentemente associados a iridociclite crônica e início oligoarticular da artrite. Os padrões de fluorescência mais frequentemente encontrados em HEp-2 são o pontilhado fino e o pontilhado fino denso e homogêneo, mas outros são eventualmente observados.

Fatores reumatóides ocorrem em 5 a 25% dos casos de AIJ,<sup>27</sup> são geralmente de classe IgM e estão associados à forma de início poliarticular da artrite, semelhante à artrite reumatoide do adulto.

A pesquisa de anticorpos antipeptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP), um novo marcador diagnóstico da artrite reumatoide do adulto, de alta especificidade, tem sido utilizada em pacientes com AIJ, mas, aparentemente, sua utilidade é limitada em crianças. Esses anticorpos parecem ocorrer com alta frequência apenas na forma de início poliarticular, em que há positividade também para o fator reumatoide.<sup>28</sup>

**Quadro 34.13 ▪ Subtipos de artrites idiopáticas juvenis.**

Subtipo	Articulações afetadas	Iridociclite	Sintomas sistêmicos	Fator reumatoide	FAN
Início sistêmico	Todas	Rara	Febre alta, <i>rash</i> cutâneo, polisserosite, organomegalia, leucocitose, anemia	Não	Não
Início poliarticular, fator reumatoide negativo	Todas	Rara	Mal-estar, febre baixa	Não	25%
Início poliarticular, fator reumatoide positivo	Todas	Rara	Mal-estar, febre baixa, Sjögren, Felty	100%	50 a 70%
Oligoarticular tipo I	Grandes articulações: joelho, tornozelo, cotovelo	20% (95% se menina, FAN +)	Raros	5%	40 a 75%
Oligoarticular tipo II	Grandes articulações, sacroileíte, entesite	10 a 20% (aguda)	Raros	Não	Não
Oligoarticular tipo III	Pequenas e grandes, assimetricamente (psoriásica)	10 a 20% (crônica)	Raros	Não	15 a 50%



## ► Referências bibliográficas

1. Reichlin M, Harley JB. Antinuclear antibodies: an overview. In: Dubois' Lupus Erythematosus 5<sup>th</sup> edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997; p. 397-405.
2. Dellavance A *et al.* 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. Rev Bras Reumatol 2009; 49(2):89-109.
3. Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H *et al.* Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30(3):529-558.
4. Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:311-335.
5. Bonfá E, Golombek SJ, Kaufman LD *et al.* Association between lupus erythematosus and antiribosomal P protein antibodies. N Engl J Med 1987; 317:265.
6. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978; 121:2228-2234.
7. Harley JB, Alexander EL, Arnett FC *et al.* Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB in patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1986; 29:196-206.
8. Mond CB, Peterson MG, Rothfield NF. Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity rash in systemic lupus erythematosus patients. Arthritis Rheum 1989; 32:202-204.
9. Watson RM, Lane TA, Barnett NK *et al.* Neonatal lupus erythematosus. Medicine 1984; 63: 362-378.
10. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I *et al.* Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anticentromere antibody and its relationship to CREST syndrome. Arthritis Rheum 1980; 23:617.
11. Catoggio LJ, Bernstein RM, Black CM *et al.* Serological markers in systemic sclerosis. Clinical correlations. Ann Rheum Dis 1983; 42:23.
12. Reichlin M, Arnett FC. Multiplicity of antibodies in myositis sera. Arthritis Rheum 1984; 27:1150-1156.
13. Medsger TA Jr. Inflammatory diseases of muscle. In: Kelley WN, ed. Textbook of Internal Medicine. Philadelphia: JB Lippincott, 1989, vol. 1, p. 1007-1009.
14. Oddis CV, Medsger TA Jr, Cooperstein LA. A subluxing arthropathy associated with anti-Jo-1 antibody in polymyositis/dermatomyositis. Arthritis Rheum 1990; 33:1640-1645.
15. Arnett FC, Hirsch TJ, Bias WB *et al.* The Jo-1 antibody system in myositis: relationships to clinical features and HLA. J Rheumatol 1981; 8:925-930.
16. Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. Arthritis Rheum 1985; 28:796-803.
17. Rider LG *et al.* A broadened spectrum of juvenile myositis: myositis-specific autoantibodies in children. Arthritis Rheum 1994; 37:1534.
18. Targoff IN, Johnson AE, Miller FW. Antibody to signal recognition particle in polymyositis. Arthritis Rheum. 1990; 33:1361-1370.
19. Savage J, Gillis D, Benson E *et al.* International statement consensus on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 2000; 113(3):445-446.
20. Gross WL. Wegener's granulomatosis. New aspects of the disease course, immunodiagnostic procedures, and stage-adapted treatment. Sarcoidosis 1989; 6(1):15-29.
21. Savage J. Testing for antineutrophil cytoplasmic antibodies. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1(3):281-289.
22. Bukhari M, Lunt M, Harrison BJ *et al.* Rheumatoid factor is the major predictor of increasing severity of radiographic erosions in rheumatoid arthritis: results from the Norfolk Arthritis Register Study, a large inception cohort. Arthritis Rheum 2002; 46(4):906-912.
23. van Jaarsveld CH, Ter Borg EJ, Jacobs JW *et al.* The prognostic value of the antiperinuclear factor, anticitrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 1999; 17:689-697.
24. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ *et al.* Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 1998; 101:273-281.
25. Hitchon C, El-Gabalawy H. Immune features of seronegative and seropositive arthritis in early synovitis studies. Curr Opin Rheumatol. 2002; 14:348-353.
26. Szer W, Sierakowska H, Szer IS. ANA profile in juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1991; 18: 401-408.
27. Cassidy JT, Petty RE. Textbook of pediatric rheumatology, 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Churchill Livingstone; 1995: 168-176.
28. Low JM, Chauhan AK, Kitz DA *et al.* Determination of anticyclic citrullinated peptide antibodies in the sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol 2004; 31(9): 1829-1833.



# Índice Alfabético

- A**
- Absorbância, 30
  - Ácido hialurônico, 187
  - Acromonium falciforme*, 437
  - Actinomicose
    - de tipo endógeno, 438
    - de tipo exógeno, 438
  - Acurácia, 9
  - Adenina, 55
  - Adenosina deaminase, 246
  - Adiaconídios, 373
  - Aedes aegypti*, 70
  - Aedes albopictus*, 70
  - Aglutinação, 18, 272
    - com micropartículas, 210
    - de látex, 210, 273
      - - doença de Chagas, 273
      - direta, 273
      - - doença de Chagas, 273
      - macroscópica, 222
      - passiva
      - - de partículas de látex, CMV, 64
      - - hidatidose, 342
  - Agravamento da patologia, 5
  - Albendazol, 354
  - Alergias, 450
    - diagnóstico, 450
  - Amebíase, 257
    - colite não disenterica, 259
    - cultura de, 264
    - diagnóstico
      - - laboratorial, 259
      - - molecular, 265
    - diferenciação das amebas parasitos do trato intestinal, 265
    - disenteria amebiana, 258
    - extraintestinal, 259
    - forma assintomática intestinal, 258
    - formas sintomáticas, 258
    - intestinal, 258
    - testes imunológicos, 264
  - American Typing Culture Collection (ATCC), 166
  - Amplificação
    - e detecção em tempo real, 109
    - isotérmica, 250
  - Angina estreptocócica, 184
  - Anti-hialuronidase (AHAD), 185
  - Anti-SLO, 185
  - Antibióticos betalactâmicos, 178
  - Anticorpos
    - anticromatina, 465
    - antidsDNA, 465
    - antinucleares, 465
    - heterófilos, 138
    - monoclonais, toxocaríase, 358
  - Antidesoxirribonuclease-B (ADNase-B), 185
  - Antiesterase (ASE), 185
  - Antiestreptolisina O – ASLO, 185
  - Antiestreptoquinase (ASK), 185
  - Antifúngico(s), 393
    - testes de sensibilidade a, 387
  - Antígeno
    - pesquisa de, 6
    - Toxocaríase, 355
    - - recombinantes, 359
  - Antimicrobianos
    - resistência a, 176
  - Antinicotinamida adenina dinucleotidase (ANADase), 185
  - Antinucleossomo, 465
  - Antirretrovirais
    - mutações e resistência aos, 107
  - Aplicação de testes diagnósticos, 10
  - Arrays, 117
  - Artrite(s)
    - idiopáticas juvenis, 469
    - reumatoide, 468
    - séptica, 171
  - Artroconídios, 371, 373
  - Ascostroma, 371
  - Aspergillus*, 366
  - Aspergilose, 426
  - Assimilação, 381
  - Autoanticorpos, 462
  - Automação, 41
  - Autorradiografia, 26
    - direta, 26
  - Avaliação
    - artificialmente induzida, 5
    - da eficácia da terapêutica, 5
    - da imunidade específica naturalmente adquirida, 5
    - da suspensão da terapêutica, 5
    - do prognóstico da doença, 5
  - Avidez de anticorpos IgG, 151
    - toxocaríase, 358
  - Avoparcina, 163
  - Azul de diazônio B, 382
  - Azul de metileno, 261
- B**
- B. timori*, 330
  - Baciloscopia, 245
  - Bacteriemia por estafilococos, 171
  - Basófilos, 455
  - Bioluminescência, 43
  - Blastomicose
    - queloidiana, 438
    - sul-americana, 416
  - Bolor, 366
  - Broncoprovocação, 453
  - Brugia malayi*, 330
- C**
- Candida albicans*, 366, 385
    - sistemas para identificação de, 384
  - Candidíase, 403
  - Cápsulas prolíferas, 338
  - Cardiopatia reumática crônica, 184
  - cDNA viral, Determinação qualitativa, 109
  - Células escleróticas, 373
  - Celulites por estafilococos, 171
  - Cepa padrão, 393
  - Chagoma de inoculação, 270
  - Chance, 8
  - Chlamydia pecorum*, 195
  - Chlamydia pneumoniae*, 195
  - Chlamydia trachomatis*, 195
  - Chlorella*, 366
  - Cisto hidático, 338
  - Citologia
    - filariose bancroftiana, 335
  - Citomegalia, 4, 62
    - características do vírus, 62
    - aspectos clínicos e epidemiológicos, 62
    - diagnóstico laboratorial, 63
    - correlação clinicolaboratorial, 65
  - Citomegalomononucleose, 66
  - Citomegalovírus, 62
    - infecção
      - - adquirida, 62
      - - congênita, 62
      - - perinatal, 62
    - no paciente imunocomprometido, 63
  - Citometria de fluxo, 45
  - Citosina, 55
  - Cladosporium*, 366
  - Clamídias e clamidófilas, infecções por, 195
    - análise citológica, 200
    - enzaimunoensaio direto, 201
    - enzaimunoensaio, 202
    - epidemiologia, 195
    - hibridização de ácidos nucleicos, 203
    - identificação direta, 200
    - *immunoblot*, 202
    - importância clínica, 195
    - imunofluorescência direta, 200
    - imunofluorescência indireta, 201
    - inibidores da transcriptase reversa, 105
    - interpretação e repercussão dos resultados, 204
    - métodos indiretos, 201
    - métodos laboratoriais de diagnóstico, 200
    - microimunofluorescência, 201
    - patogenicidade, 196
    - reação de fixação do complemento, 201
    - resposta imune inata e adaptativa e mecanismos de evasão, 198
    - técnicas de aplicação de ácidos nucleicos, 202
    - transmissão, 195
  - Clamidífilas, 195
  - Classificação de Lancefield, 184
  - Clone de cDNA infeccioso, 90
  - Cloranfenicol, 376
  - Clostridium difficile*, 164



*Coccidioides immitis*, 425  
 Coccidioidomicose, 425  
 Coinfecção tuberculose/HIV, 243  
 Coleta e transporte de material biológico, 369  
 Colite não disenterica, 259  
 Coloração  
 - de Giemsa, 220  
 - de hematoxilina-eosina, 374  
 Complexo MAC, 249  
 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, 249  
 Concentração, 393  
 - inibitória mínima, 393  
 Conegatividade, 7  
 Conídios, 371  
 Contraímunoelctroforese, 222  
 - hidatidose, 343  
 Copositividade, 7  
 Coreia de Sydenham, 185  
 Crescimento residual, 393  
 Crioaglutininas, 209  
 Criptococose, 408  
 Critério de cura, 6  
 Cromoblastomicose, 431  
*Cryptococcus*, 366, 385  
*Cryptococcus gattii*, 408  
*Cryptococcus neoformans*, 408  
*Cryptosporidium spp.*, 301  
 Cura, critério de, 6  
 Curva de unidade padrão, 30  
 Curva receiver operating characteristics, 11  
*Cyclospora cayetanensis*, 301

## D

Dengue  
 - diagnóstico laboratorial, 70  
 Dermatofitos, 402  
 Dermatofitoses, 397  
 Dermatômiosite, 467  
 Detecção  
 - de ácidos nucleicos, toxoplasmose, 306  
 - de anticorpos  
 - - ASLO pelo método nefelométrico ou turbidimétrico, 186  
 - - IgA e IgE, toxoplasmose, 308  
 - - IgM, toxoplasmose, 307  
 - de antígenos de *T. cruzi*, 275  
 - de imunoprecipitados, 36  
 - do antígeno pp65 em neutrófilos (antigenemia), CMV, 63  
 - do fator corda, 246  
 Dexametasona, 230  
 Diagnóstico  
 - de doença congênita, 4  
 - histocitopatológico, filariose bancroftiana, 334  
 - individual, pesquisa de anticorpos no, 4  
 - molecular, 55  
 - - filariose bancroftiana, 334  
 - por imagem, neurocisticercose, 349  
 Didanosina, 105  
 Dietilcarbamazina, 354  
 Diferenciação da fase da doença, 4  
 Dimorfismo, 377  
 Dinâmica viral e *quasispecies*, 100  
 Doadores  
 - de órgãos para transplantes, 4  
 - de sangue, 4, 6  
 Doença  
 - erradicação da, 5  
 - etiologia da, 6  
 - prevalência da, 5, 7  
 Doença congênita  
 - diagnóstico de, 4

Doença de Bancroft, 330  
 Doença de Chagas, 4  
 - apresentação  
 - - adquirida, 270  
 - - congênita, 270  
 - aspectos clínicos, 270  
 - aspectos epidemiológicos, 270  
 - diagnóstico  
 - - de laboratório, 271  
 - - - padronização do, 275  
 - - parasitológico, 271  
 - - sorológico, 272  
 Doença de Darling, 419  
 Doença de inclusão citomegálica, 62  
 Doença extralinfática, 331  
 Doença linfática, 330  
 Doença mista do tecido conjuntivo, 467  
 Doença muscular inflamatória autoimune, 467  
 Doença renal, 331  
 Doenças alérgicas, 450  
 - diagnóstico, 450  
 Doenças autoimunes sistêmicas, 461  
 Dosagem  
 - de ECP, 455  
 - de IgE específica, 453  
 - de IgE total, 453  
 - de IgG específica, 454  
 - de triptase, 454  
 Dot-ELISA, toxocaríase, 358  
 Dupla imunodifusão de Ouchterlony, 14

## E

*Echinococcus granulosus*, 338  
*Echinococcus multiloculares*, 338  
*Echinococcus oliganthus*, 338  
*Echinococcus vogeli*, 338  
 Ecografia  
 - hidatidose, 340  
 Eczema, 353  
 Eficácia da terapêutica, 5  
 Eficiência, 7  
 Eletroforese, 15  
 - capilar, 18  
 - de zona, 15  
 Eletroimunodifusão, 16  
 - dupla unidimensional, 16  
 - simples unidimensional, 16  
 ELISA, 28, 210  
 - doenças autoimunes, 463  
*Endolimax nana*, 266  
 Enfuvirtida, 105  
 Ensaio(s)  
 - de neutralização da hemólise, 21  
 - imunoenzimático, Esquistossomose mansônica, 323  
 - imunorradiométrico, 25  
 - imunocromatográficos, 39  
 - líticos, 20  
 - multiparamétricos, 46  
 - para anticorpos, 30  
 - para antígenos, 31  
 - quimioluminescentes, 36  
 Ensaios multiplex  
 - doenças autoimunes, 464  
*Entamoeba coli*, 266  
*Entamoeba dispar*, 265  
*Entamoeba hartmanni* (comensal), 265  
*Entamoeba histolytica*, 258  
 Enterococcias  
 - epidemiologia, 162  
 - interpretação do diagnóstico laboratorial, 166  
 - microbiologia, 158  
 - significado clínico, 162  
 Enterococos, 158  
 - resistentes à vancomicina, 162, 163  
 Enzimaimunoensaio, 28, 43, 202, 274  
 - doença de Chagas, 274  
 - fluorescente, 45  
 - - heterogêneo, 45  
 - - para a pesquisa de IgE, 45  
 - homogêneo, 33  
 - quimioluminescente, 36  
 - - com nanopartículas, 37  
 Eosinofilia pulmonar tropical, 331  
*Epidemiological cut-off values*, 393  
*Epidermophyton*, 403  
 Erisipela, 184  
 Eritrasma, 397  
 Erradicação  
 - da doença, 5  
 - da rubéola, 145  
 Escarlatina, 184  
 Escarro de expectoração, 244  
 Esclerodermia, 466  
 Esclerose sistêmica, 466  
 Esférulas, 373  
 Especificidade, 7  
 - relativa, 7  
 Esporângios, 372  
 Esporotricose, 434  
 Esquistossomose mansônica, 320  
 - diagnóstico  
 - - anatomopatológico, 322  
 - - imunológico, 322  
 - - laboratorial, 320  
 - - molecular, 322  
 - - parasitológico, 320  
 - método(s)  
 - - de Barbosa, 321  
 - - de Bell, 321  
 - - de Kato-Katz, 321  
 - - de sedimentação espontânea, 321  
 - - de Teesdale, 322  
 - - coprológicos  
 - - - qualitativos, 320  
 - - - quantitativos, 321  
 - pesquisa de anticorpos, 323  
 - técnica com uso de  
 - - esferas paramagnéticas, 322  
 - técnica de sedimentação diferencial, 322  
 - técnica rápida para três  
 - - amostras fecais, 322  
 - teste de eclosão de miracídeos, 321  
 Estafilococcias  
 - infecções por estafilococos resistentes à meticilina, 171  
 - gênero *Staphylococcus*, 172  
 - resistência a antimicrobianos, 176  
 - métodos laboratoriais, 180  
 Estafilococos coagulase-negativos, 175  
 Estreptococcias  
 - classificação geral, 184  
 - etiopatogenia, 184  
 - *Streptococcus agalactiae*, 187  
 - *Streptococcus pneumoniae*, 189  
 - *Streptococcus pyogenes*, 184  
 - vacinas, 190  
 Estreptococos  
 - beta-hemolíticos do grupo A, 21  
 - de origem fecal, 158  
 Etiologia da doença, 6  
 Exame de LCR, 229  
 Exame histopatológico e citológico, CMV, 63  
 Exatidão, 9  
 Expectoração induzida, 244



**F**

Fagotipagem, 179  
 Falso-negativo (FN), 7  
 Falso-positivo (FP), 7  
 Faringite estreptocócica, 185  
 Faringoamigdalite, 184  
 Febre reumática aguda, 184  
 Fenbendazol, 354  
 Fenol-oxidase, 382  
 Fenômeno *trailing*, 393  
 Fenotipagem do HIV, 110  
 Feo-hifomicose, 432  
 Fermentação, 381  
 Feto  
 - toxoplasmose no, 310  
 Fezes  
 - pesquisa direta do parasito nas, 260  
 Fibronectina, 187  
 Filariose bancroftiana, 329  
 - complicações, 332  
 - condutas de tratamento, 332  
 - correlação clinicolaboratorial, 330  
 - diagnóstico da infecção ativa, 333  
 - doença  
 - - extralinfática, 331  
 - - linfática, 330  
 - - renal, 331  
 - eosinofilia pulmonar tropical, 331  
 - linfocintigrafia, 335  
 - pesquisa de vermes adultos, 333  
 - - citologia, 335  
 - - diagnóstico histocitopatológico, 334  
 - - diagnóstico molecular, 334  
 - - exame clínico, 334  
 - - histopatologia, 334  
 - - imunodiagnóstico, 334  
 - - pesquisa de anticorpo circulante, 334  
 - - pesquisa de antígeno circulante, 334  
 - pesquisa e quantificação de microfilárias, 333  
 Filariose linfática, 330  
 Fixação do complemento, 20, 209, 222, 272  
 - CMV, 64  
 - doença de Chagas, 272  
 - hidatidose, 342  
 Flaviviridae, 83  
 Floculação  
 - da bentonita  
 - - hidatidose, 342  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 Flubendazol, 354  
 Fluorocromos, 21  
 Fluorografia, 26  
 Fungos  
 - demácios, 431  
 - filamentosos, 377  
 Furúnculos, 171  
*Fusarium*, 366

**G**

Gamografia  
 - hidatidose, 340  
 Genes virais acessórios e regulatórios, 99  
 Genoma viral, 98  
 Genotipagem do HIV, 110  
 Gestantes  
 - toxoplasmose em, 309  
 Glomerulonefrite, 184  
 Gota espessa  
 - malária, 287  
 Grãos, 373  
 Guanina, 55

**H**

*Haemophylus ducreyi*, 166  
 Hemaglutinação, 273  
 - doença de Chagas, 273  
 - doenças autoimunes, 463  
 - passiva  
 - - hidatidose, 342  
 Hematoxilina férrica, 262  
 Hemocultura, 220, 271  
 - doença de Chagas, 271  
 Hepatites virais  
 - Hepatite A, 74  
 - - características, 74  
 - - constituição genômica do vírus, 74  
 - - diagnóstico, 75  
 - - epidemiologia, 75  
 - - evolução clínica, 75  
 - - prevenção, 76  
 - - transmissão, 75  
 - Hepatite B, 76  
 - - características, 76  
 - - ciclo de replicação viral, 77  
 - - constituição genômica do vírus, 76  
 - - diagnóstico, 79  
 - - marcadores virais, 78  
 - - polimorfismo genético do HBV, 78  
 - - prevenção, 80  
 - - transmissão, 79  
 - - tratamento, 81  
 - Hepatite C, 82  
 - - características, 83  
 - - constituição genômica do vírus, 83  
 - - diagnóstico laboratorial, 84  
 - - epidemiologia, 83  
 - - genotipagem, 86  
 - - genótipos, 83  
 - - patogênese, 82  
 - - transmissão, 82  
 - - tratamento, 87  
 - Hepatite delta, 87  
 - - características, 87  
 - - constituição genômica do vírus, 87  
 - - diagnóstico laboratorial, 88  
 - - patogênese da, 88  
 - - transmissão, 88  
 - - tratamento, 89  
 - Hepatites não A, não B, não C, não D, não E  
 (não A-E), 91  
*Herpesviridae*, 62  
 Hialo-hifomicose, 425  
 Hibridação, 210  
 - de ácidos nucleicos, 203  
 - *in situ*, 118  
 Hidátide, 338  
 Hidatidose, 338  
 - etiologia, 338  
 - epidemiologia, 339  
 - diagnóstico, 340  
 Hidrocele, 330  
 Hifas, 366, 371, 373  
 - hialinas septadas, 371, 373  
 - septadas demácias, 373  
 - verdadeiras, 371  
 Hipersensibilidade tardia, 452  
 Histamina, 455  
 Histopatologia  
 - filariose bancroftiana, 334  
*Histoplasma capsulatum*, 366, 419  
 Histoplasmoses, 419  
 HIV, infecção por  
 - considerações gerais, 98  
 - dados estatísticos, 104

- diagnóstico laboratorial, 108  
 - distribuição geográfica dos subtipos, 104  
 - e marcadores virais, 108  
 - epidemiologia, 103  
 - estrutura viral, 98  
 - fármacos antirretrovirais, 105  
 - fenotipagem, 110  
 - genotipagem do, 110  
 - meios de transmissão, 103  
 - morfologia, 98  
 - patogênese, 102  
 - replicação viral, 101  
 - sistema imune, 102  
 - subtipos genéticos, 100  
 - testes imunológicos, 108  
 HPV, infecção por  
 - *arrays*, 117  
 - carga viral e infecções múltiplas, 119  
 - classificação e nomenclatura, 114  
 - diagnóstico laboratorial, 116  
 - epidemiologia do câncer cervical, 115  
 - hibridização *in situ*, 118  
 - histórico, 114  
 - RNA mensageiro viral, 117  
 - teste citológico, 116  
 - teste de amplificação de sinal, 116  
 - testes com base em PCR, 117  
 - testes moleculares, 116  
 - uso dos testes de  
 - - na triagem de pacientes com citologia  
 alterada/indeterminada, 119  
 - - no rastreio de câncer cervical, 118  
 - - pós-tratamento, 119  
 HTLV-I e HTLV-II, infecções por  
 - agente etiológico, 121  
 - diagnóstico, 125  
 - diagnóstico molecular, 128  
 - epidemiologia, 123  
 - estrutura da partícula viral, 121  
 - estrutura genômica, 121  
 - isolamento viral, 130  
 - manifestações clínicas, 122  
 - mecanismos de transmissão, 125  
 - monitoramento da carga proviral, 130  
 - patogênese, 122  
 - resposta imunológica, 122  
 - testes confirmatórios, 126  
 - testes confirmatórios sorológicos, 127  
 - testes de triagem sorológica, 125

ID 32C®, 383  
 IgE específica, 453, 454  
*Immunoblot*, 202, 455  
 - neurocisticercose, 349  
 - toxocaríase, 358  
*Immunodot*, 33  
 - quimioluminescente, 37  
 Impetigo, 171  
 Impregnação pela prata, 220  
 Imunidade  
 - artificialmente induzida, 5  
 - específica naturalmente adquirida, 5  
 Imuno-histoquímica  
 - e imunocitologia, CMV, 63  
 - toxocaríase, 359  
 Imunocromatográficos, 275  
 Imunodeficiente  
 - toxoplasmose no, 310  
 Imunodiagnóstico  
 - filariose bancroftiana, 334  
 Imunodifusão, 14



- radial dupla, hidatidose, 342
  - radial simples, 14
  - simples em uma dimensão, 14
  - Imunoelektroforese, 17
  - hidatidose, 342
  - Imunoelektrotransferência
  - hidatidose, 343
  - Imunoensaio
  - de polarização da fluorescência, 44
  - fluorescente, 43
  - - com substrato marcado, 45
  - - de tempo controlado, 44
  - - heterogêneo, 43
  - - homogêneo, 44
  - quimioluminescente, 43
  - Imunofixação, 17
  - Imunofluorescência, 21, 220, 222, 273
  - doença de Chagas, 273
  - indireta, 201, 209
  - - doenças autoimunes, 462
  - - hidatidose, 342
  - Imunoglobulina E
  - toxocaríase, 359
  - Imunoglobulina IgG, 4
  - Imunoglobulina IgM, 4
  - Imunomicroscopia eletrônica HEV, 91
  - Imunopatogênese da infecção pelo HIV em pediatria, 103
  - Imunoperoxidase, 27
  - Infecção(ões)
  - causadas por espécies de *Malassezia*, 393
  - CMV
  - adquirida, 66
  - congênita, 65
  - intrauterina, 65
  - fúngicas
  - - exames micológicos, 6
  - - fungos demácios, 68
  - - fungos dimórficos, 54
  - - identificação de culturas de fungos, 14
  - - metodologias auxiliares de diagnóstico micológico, 23
  - - micoses cutâneas, 35
  - - - e sistêmicas, 41
  - - micoses superficiais, 31
  - - outras micoses, 76
  - - qualidade em laboratório de micologia, 5
  - perinatal, 66
  - por HIV
  - - considerações gerais, 98
  - - dados estatísticos, 104
  - - diagnóstico laboratorial, 108
  - - distribuição geográfica dos subtipos, 104
  - - e marcadores virais, 108
  - - epidemiologia, 103
  - - estrutura viral, 98
  - - fármacos antirretrovirais, 105
  - - fenotipagem, 110
  - - genotipagem do, 110
  - - meios de transmissão, 103
  - - morfologia, 98
  - - patogênese, 102
  - - replicação viral, 101
  - - sistema imune, 102
  - - subtipos genéticos, 100
  - - testes imunológicos, 108
  - por HPV
  - - arrays, 117
  - - carga viral e infecções múltiplas, 119
  - - classificação e nomenclatura, 114
  - - diagnóstico laboratorial, 116
  - - epidemiologia do câncer cervical, 115
  - - hibridização *in situ*, 118
  - - histórico, 114
  - - RNA mensageiro viral, 117
  - - teste citológico, 116
  - - teste de amplificação de sinal, 116
  - - testes com base em PCR, 117
  - - testes moleculares, 116
  - - uso dos testes de
  - - - na triagem de pacientes com citologia alterada/indeterminada, 119
  - - - no rastreio de câncer cervical, 118
  - - - pós-tratamento, 119
  - por HTLV-I e HTLV-II
  - - agente etiológico, 121
  - - diagnóstico, 125
  - - diagnóstico molecular, 128
  - - epidemiologia, 123
  - - estrutura da partícula viral, 121
  - - estrutura genômica, 121
  - - isolamento viral, 130
  - - manifestações clínicas, 122
  - - mecanismos de transmissão, 125
  - - monitoramento da carga proviral, 130
  - - patogênese, 122
  - - resposta imunológica, 122
  - - testes confirmatórios, 126
  - - testes confirmatórios sorológicos, 127
  - - testes de triagem sorológica, 125
  - por Micoplasmas, 207
  - da pele por *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, 171
  - por clamídias e clamidófilas, 195
  - - análise citológica, 200
  - - enzimaensaio, 202
  - - enzimaensaio direto, 201
  - - epidemiologia, 195
  - - hibridização de ácidos nucleicos, 203
  - - identificação direta, 200
  - - *immunoblot*, 202
  - - importância clínica, 195
  - - imunofluorescência direta, 200
  - - imunofluorescência indireta, 201
  - - inibidores da transcriptase reversa, 105
  - - interpretação e repercussão dos resultados, 204
  - - métodos indiretos, 201
  - - métodos laboratoriais de diagnóstico, 200
  - - microimunofluorescência, 201
  - - patogenia, 196
  - - reação de fixação do complemento, 201
  - - resposta imune inata e adaptativa e mecanismos de evasão, 198
  - - técnicas de aplicação de ácidos nucleicos, 202
  - - transmissão, 195
  - Inibidores
  - de fusão, 108
  - de integrase, 108
  - de protease, 106
  - de RT
  - - análogos de nucleosídeo (NRTI), 105, 107
  - - não análogos de nucleosídeo (NNRTI), 107
  - Inoculação em camundongo
  - doença de Chagas, 271
  - isolamento do *Toxoplasma*, 305
  - Inquéritos epidemiológicos, 6
  - pesquisa de anticorpos em, 5
  - Interferon-gama
  - detecção e quantificação de, 247
  - Interpretação dos testes sorológicos, 186
  - Intoxicação alimentar, 171
  - Intradermoreação de Casoni
  - hidatidose, 341
  - Iodamoeba butschlii*, 266
  - Isolado
  - não selvagem, 393
  - selvagem, 393
  - Isolamento
  - do citomegalovírus em culturas celulares, 64
  - do toxoplasma, 305
  - - em cultura de células, 305
  - em animais de laboratório, 221
  - Ivermectina, 354
- 
- ## L
- 
- Lacaziose, 438
  - Lavado
  - brônquico, 244
  - gástrico, 244
  - Leishmania*, 278
  - Leishmanioses
  - visceral, diagnóstico, 278
  - - parasitológico, 279
  - - imunológico, 279
  - - clínico e epidemiológico, 278
  - tegumentar, diagnóstico, 280
  - - clínico e epidemiológico, 280
  - - imunológico, 281
  - - parasitológico, 281
  - Leptospiras, 219
  - Leptospirose humana, 219
  - aglutinação macroscópica, 222
  - coloração de Giemsa, 220
  - contraímunoelutroforese, 222
  - diagnóstico laboratorial, 220
  - fixação de complemento, 222
  - hemocultura, 220
  - impregnação pela prata, 220
  - imunofluorescência, 220, 222
  - isolamento em animais de laboratório, 221
  - métodos imunológicos, 221
  - microscopia de campo escuro, 220
  - reação de hemaglutinação, 222
  - teste de microaglutinação, 221
  - Leucemia, 122
  - Leveduras, 366, 371
  - meios diferenciais para, 384
  - sistemas comerciais para a identificação de, 382
  - testes de detecção, 379
  - Leveduriforme, 372
  - Limiar de reatividade ou *cut-off*, 10
  - Linfedema, 330
  - Linfocintigrafia, 335
  - Linfogranuloma venéreo, 195
  - Linfoma de células T do adulto, 122
  - Linfoproliferação, 454
  - Líquido hidático, 338
  - Lúpus eritematoso sistêmico
  - doenças autoimunes, 465
- 
- ## M
- 
- M. fermentans*, 214
  - M. penetrans*, 214
  - M. pirum*, 214
  - Madurella grisea*, 437
  - Madurella mycetomatis*, 437
  - Malária
  - diagnóstico
  - - clínico, 286
  - - de laboratório, 286
  - gota espessa, 287
  - métodos para detecção
  - - de anticorpos, 293
  - - - contra antígenos do estágio eritrocítico
  - - - - assexuado, 293, 294
  - - - - sexuado, 294
  - - - contra esporozoítos, 294
  - - de componentes antigênicos plasmodiais, 291



- de DNA ou RNA de plasmódio no sangue, 288
- de plasmódios nas hemácias, 287
- métodos para pesquisa do esporozoítio no mosquito, 295
- PCR com base na amplificação do gene da subunidade 18s do rRNA, 288
- PCR em tempo real quantitativo, 290
- *quantitative buffy coat*, 288
- testes funcionais do estado imune, 295
- transmitida por transfusão, 295
- Malassezia*, 379, 385
- infecções causadas por espécies de, 393
- Marcadores radioativos, 24
- Mastite estafilocócica, 171
- Mebendazol, 354
- Meios
  - cromogênicos, 382
  - diferenciais para leveduras, 384
- Membrana hidática, 338
- Meningites bacterianas agudas, 228
  - complicações, 233
  - corticosteroides, 230
  - diagnóstico, 229
  - diagnóstico diferencial, 232
  - evolução, 232
  - meningites recorrentes, 233
  - profilaxia, 232
  - quadro clínico, 228
  - tratamento, 230
- Meningites recorrentes, 233
- Meticilina
  - infecções por estafilococos resistentes à, 171, 178
- Método da dose efetiva, 30
- Método da imunoferritina, 38
- Método de Barbosa, 321
- Método de Bell, 321
- Método de captura para anticorpos IgM, 31
- Método de coloração pelo tricrômio, 261
- Método de competição, 44
  - com anticorpo marcado, 32
- Método de Fahey, 15
- Método de Faust, 263
- Método de inibição para haptenos, 32
- Método de Kato-Katz, 321
- Método de Mancini, 15
- Método de sedimentação espontânea, 321
- Método de Teesdale, 322
- Método direto a fresco corado pelo azul de metileno, 261
- Método do duplo anticorpo ou do "sanduíche", 44
- Método do ouro coloidal, 39
- Método enzimático, 38
- Método fluoroimunométrico, 44
- Método reação em cadeia da polimerase, 4
- Métodos coprológicos
  - qualitativos, 320
  - quantitativos, 321
- Métodos de detecção
  - doenças autoimunes, 462
- Métodos imunodiagnósticos
  - neurocisticercose, 349
- Métodos laboratoriais de triagem de enterococos resistentes, 164
- Métodos para detecção de anticorpos, 293
  - contra antígenos do estágio eritrocítico
  - - assexuado, 293, 294
  - - sexuado, 294
  - contra esporozoítos, 294
- Métodos para detecção, malária,
  - de componentes antigênicos plasmodiais, 291
  - de DNA ou RNA de plasmódio no sangue, 288
  - de plasmódios nas hemácias, 287
- Métodos para pesquisa do esporo, 295

- Métodos proporcionais, 30
- Métodos radiológicos
  - hidatidose, 340
- Micetoma, 435
  - eumicótico, 437
- Micobactérias
  - identificação das, 248
  - sensibilidade das, 249
- Micobacterioses, 248
- Micoplasmas
  - colonizadores do trato urogenital, 211
  - como cofatores do HIV, 214
- Micro-hematócrito, 271
  - doença de Chagas, 271
- Microarranjos
  - com micropartículas, 48
  - com proteínas ligadas, 47
  - de alérgenos, 454
- Microfilárias, 333
- Microimunofluorescência, 201
- Microscopia
  - de campo escuro, 220
  - direta, doença de Chagas, 271
  - eletrônica, CMV, 63
  - imunoelétrica, 37
- Microsporídeos, 302
- Microsporium*, 403
- MicroScan Yeast Identification Panel®, 384
- Mielopatia associada ao HTLV-I, 123
- Miocardite crônica difusa, 270
- Mononucleose infecciosa
  - características do vírus, 137
  - diagnóstico
    - - hematológico, 138
    - - laboratorial, 138
    - - sorológico, 138
  - epidemiologia, 136
  - transmissão, 136
- Múltiplo da atividade normal, 30
- Mutações de resistência
  - aos inibidores de fusão, 108
  - aos inibidores de integrase, 108
  - aos IP, 107
  - aos NNRTI, 107
  - aos NRTI, 107
  - aos antirretrovirais, 107
- Mycobacterium tuberculosis*, 243
- Mycoplasma genitalium*, 214
- Mycoplasma hominis*, 211
- Mycoplasma pneumoniae*, 208

## N

- Nefelometria, 41
  - cinética, 41
  - de ponto final, 41
  - de taxa de aumento, 41
- Nefelômetros, 42
- Nested-PCR, 289
- Neurocisticercose
  - aspectos clinicoepidemiológicos, 348
  - diagnóstico, 349
  - imunobiologia, 348
- Neurossífilis, 238
- Nódulos
  - de cor clara, 371
  - de cor escura, 371
- Non-wild type*, 393

## O

- Odds, 8
- Organização do genoma viral, 98

- Organização do trabalho por procedimentos operacionais padrão, 368
- Oxacilina, resistência à, 179
- Oxfendazol, 354

## P

- P. falciparum*, 285
- P. malariae*, 285
- P. vivax*, 286
- Paciente imunocomprometido
  - citomegalovírus no, 63, 66
- Pacientes imunodeficientes
  - toxoplasmose nos, 311
- Padrões de resistência viral, 107
- Panstrongylus megistus*, 269
- Papilomavírus humanos, 114
- Paracoccidioides brasiliensis*, 366
- Paracoccidioidomicose, 416
- Parâmetros
  - extrínsecos, 9
  - intrínsecos, 6
  - que dependem da prevalência da doença, 7
- Paraparesia espástica tropical, 123
- Patologia clínica
  - testes sorológicos na, 4
- PCR, 55
  - CMV, 64
  - com base na amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA, malária, 288
  - doença de chagas, 271
  - ELISA, 290
  - em tempo real, 210
  - - quantitativo, malária, 290
  - *multiplex*, 290
  - toxocaríase, 359
  - toxoplasmose, 306
- Penicilina, 178
- Peniciliose, 439
- Penicillium*, 366
- Perfis e marcadores sorológicos
  - toxoplasmose, 308
- Pesquisa de anticorpos, 23
  - anti-HEV
  - circulante, filariose bancroftiana, 334
  - CMV, 64
  - em inquéritos soropidemiológicos, 5
  - específicos nos fluidos biológicos, 223
  - no diagnóstico individual, 4
- Pesquisa de antígenos, 6, 23
  - circulante, filariose bancroftiana, 334
  - neurocisticercose, 349
  - toxocaríase, 359
  - toxoplasmose, 306
- Pesquisa de cistos nas fezes pelo método de Faust, 263
- Pesquisa de imunidade mediada por células, toxoplasmose, 308
- Pesquisa direta, CMV, 63
  - do parasito nas fezes, 260
- Pesquisa do antígeno do HEV, 91
- Pesquisa do RNA viral, HEV, 91
- Pichia*, 366, 385, 415
- Piedra
  - branca, 396
  - preta, 395
- Piodermite, 184
- Pitíriase versicolor, 393
- Plasmodium*, 284
  - ciclo de vida do, 284
- Plataforma Luminex®
  - doenças autoimunes, 464
- Pneumocistose, 439



Pneumonite de camundongos, 195  
 Poliartrite, 185  
 Polimiosite, 467  
 Pontos de corte, 393  
 - epidemiológicos, 393  
 Potência, 393  
 Precipitação, 13  
 - doença de Chagas, 272  
 Precisão, 9  
 Prevalência  
 - da doença, 5, 7  
 - verdadeira, 7  
 Probabilidade  
 - pós-teste, 8  
 - pré-teste, 8  
 Processos patológicos com sintomas e sinais clínicos confundíveis, 4  
 Prognóstico da doença, 5  
*Prototheca*, 366  
 Protozooses emergentes  
 - *Cryptosporidium* spp., 301  
 - *Cyclospora cayentanensis*, 301  
 - Microsporídeos, 302  
 Provocação  
 - com alimentos, 452  
 - com medicamentos, 452  
 Prurigo crônico, 353  
*Pseudallescheria boydii*, 437  
 Pseudo-hifas, 371  
 Puntura (*prick test*), 450

## Q

*Quantitative Buffy Coat* (QBC®)  
 - doença de Chagas, 271  
 - malária, 288  
 Quimioluminescência, 43

## R

Radioautografia, 26  
 Radioimunoensaio, 24  
 - de competição com anticorpo marcado, 25  
 - de fase sólida, 24  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 - hidatidose, 343  
 Reação de fixação do complemento, 201  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 Reação de hemaglutinação, 222  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 Reação de imunofluorescência indireta  
 - CMV, 64  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 Reação do látex, 186  
 Reação em cadeia da polimerase, 55  
 - CMV, 64  
 - com base na amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA, malária, 288  
 - doença de chagas, 271  
 - ELISA, 290  
 - em tempo real, 210  
 - - quantitativo, malária, 290  
 - *multiplex*, 290  
 - toxocaríase, 359  
 - toxoplasmose, 306  
 Reação intradérmica  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 Reação periovular  
 - esquistossomose mansônica, 323  
 Recém-nascido  
 - toxoplasmose no, 311  
 Receptores de órgãos para transplantes, 4  
 Reintrodução de novos casos em áreas consolidadas, 6

Reprodutibilidade, 10  
 Resistência  
 - a antimicrobianos, 176  
 - à metilicina, 178  
 - à oxacilina, 179  
 - bacteriana aos antibióticos, 162  
 - dos enterococos a antibióticos, 164  
 - intrínseca, 393  
 - secundária, 393  
 - viral, 107  
*Rhinosporidium seeberi*, 366  
*Rhodnius prolixus*, 269  
*Rhodotorula*, 385, 415  
 Rigidez de nuca, 228  
 RNA mensageiro viral, 117  
 RNA viral  
 - determinação quantitativa, 109  
 Rubéola, 4, 143  
 - aspectos clínicos, 145  
 - congênita, 146, 148  
 - diagnóstico laboratorial, 150  
 - epidemiologia, 143  
 - erradicação, 145  
 - interpretação clínica dos resultados, 147  
 - pós-natal, 145, 147  
 - prevenção, 144  
 - reinfeção, 148  
 - resposta imune à infecção, 147  
 - técnica de neutralização e teste de inibição de hemaglutinação, 150  
 - teste de aglutinação passiva, 150  
 - teste de imunofluorescência indireta, 150  
 - testes imunoenzimáticos, 150  
 - transmissão  
 - - pós-natal, 143  
 - - pré-natal, 143  
 - vacinação antirrubéola, 144  
 - vacinados, 148  
 - vírus e seus antígenos, 146

## S

Salpingite, 196  
*Schistosoma mansoni*, 320  
 Seleção de alérgenos para a pesquisa, 450  
 Seleção de doadores de sangue, 4, 6  
*Semi-nested*-PCR, 290  
 Sensibilidade, 7  
 - relativa, 7  
 Separação de células ativadas por fluorescência, 46  
 Sífilis, 4, 235  
 - congênita, 239  
 - diagnóstico laboratorial, 235  
 - neurosífilis, 238  
 - pesquisa de treponema, 235  
 - utilização e interpretação dos testes, 237  
 - testes sorológicos, 236  
 - - na avaliação do tratamento, 238  
 Sinal de Brudzinski, 228  
 Sinal de desconforto lombar, 228  
 Sinal de Kernig, 228  
 Sinal de Romã, 270  
 Síndrome da pele escaldada, 171  
 Síndrome de hipertensão intracraniana, 228  
 Síndrome de irritação meníngea, 228  
 Síndrome de Reiter, 196  
 Síndrome de Sjögren, 466  
 Síndrome do choque tóxico, 171  
 Síndrome toxêmica, 228  
 Sistema avidina/estreptavidina-biotina, 23  
 Sistema BACTEC, 245  
 Sistema de conjugação, 165

Sistemas comerciais para a identificação de leveduras, 382  
 Solução-mãe, 393  
 Soro limiar de reatividade, 30  
*Staphylococcus aureus*, 171  
*Streptococcus agalactiae*, 187  
 - desenvolvimento de resposta imune, 188  
 - etiopatogenia no recém-nascido, 187  
 - resposta imune, 187  
 - testes laboratoriais, 188  
 - vacina, 190  
*Streptococcus* grupo D, 158  
*Streptococcus pneumoniae*, 189  
 - etiopatogenia da infecção por, 189  
 - identificação do, 189  
 - resposta imune ao, 190  
 - vacina, 190  
*Streptococcus pyogenes*, 184  
 - diagnóstico laboratorial, 185  
 - resposta imune ao, 185  
 - vacina, 190  
*Streptococcus*, 171  
 Subclasses de anticorpos IgG  
 - toxocaríase, 358  
 Suspensão da terapêutica, 5

## T

*Taenia solium*, 348  
 Técnica com uso de esferas paramagnéticas, 322  
 Técnica de coloração por hematoxilina férrica, 262  
 Técnica de neutralização e teste de inibição de hemaglutinação, rubéola, 150  
 Técnica de sedimentação diferencial, 322  
 Técnica do *shell-vial*, CMV, 64  
 Técnica PAP (peroxidase-antiperoxidase), 27  
 Técnica rápida para três amostras fecais, 322  
 Técnicas com marcadores radioativos, 24  
 Técnicas de aplicação de ácidos nucleicos, 202  
 Técnicas empregadas na automação, 41  
 Técnicas imunoenzimáticas, 27  
 Telas intensificadoras, 27  
 Teorema de Bayes, 8  
 Terapia antirretroviral altamente potente, 106  
 Teste da urease, 382  
 Teste de aglutinação  
 - de cristais de colesterol, 20  
 - direta, 19  
 - do látex, 20  
 - passiva ou indireta, 19  
 - - rubéola, 150  
 Teste de amplificação de sinal, 116  
 Teste de ativação de basófilos, 455  
 Teste de avididade de anticorpos IgG, toxoplasmose, 307  
 Teste de azul de diazônio B (DBB), 382  
 Teste de contato (*patch test*), 452  
 Teste de eclosão de miracídios, 321  
 Teste de fenol-oxidase, 382  
 Teste de hemaglutinação passiva, 19  
 Teste de imunofluorescência, 21  
 - direta, 22  
 - indireta, 23  
 - - rubéola, 150  
 Teste de infectividade em coelho e pesquisa de DNA, 235  
 Teste de inibição  
 - da IgE específica, 454  
 - de hemaglutinação direta, 19  
 - de hemaglutinação passiva, 19  
 Teste de liberação de histamina, 455  
 Teste de microaglutinação, 221



Teste de Montenegro, 281  
 Teste de Paul-Bunnell-Davidsohn, 138  
 Teste de suscetibilidade em meio líquido, 393  
 Teste diagnóstico, validação de um, 6  
 Teste do autossoro, 453  
 Teste imunoenzimático ELISA  
   - neurocisticercose, 349  
   - toxocaríase, 356  
 Teste imunoenzimático fluorimétrico  
   específico, hidatidose, 343  
 Teste para amplificação de ácidos nucleicos, 250  
 Teste tuberculínico, 247  
 Testes bioquímicos  
   - fungos filamentosos, 378  
 Testes com base em PCR, 117  
 Testes cutâneos  
   - de hipersensibilidade tardia, 452  
   - de leitura imediata, 450  
   - - com medicamentos, 451  
   - - no diagnóstico da alergia alimentar, 451  
   - de leitura tardia, 451  
   - intradérmicos, 451  
 Testes de biologia molecular, HIV, 109  
 Testes de captura de anticorpos IgM,  
   toxoplasmose, 307  
 Testes de cardiolipina, 236  
 Testes de hemaglutinação, toxoplasmose, 307  
 Testes de hibridização  
   - de ácido nucleico, fungos filamentosos, 378  
   - em fase sólida, 252  
 Testes de provocação, 452  
 Testes de sensibilidade a antifúngicos, 387  
   - conceitos e definições, 393  
 Testes diagnósticos, 10  
   - aplicação, 10  
 Testes fisiológicos, leveduras, 381  
 Testes funcionais do estado imune, malária, 295  
 Testes imunocromatográficos, doença  
   de Chagas, 275  
 Testes imunoenzimáticos  
   - CMV, 65  
   - hidatidose, 343  
   - rubéola, 150  
   - toxoplasmose, 306  
 Testes *in vitro*, 453  
 Testes moleculares  
   - para a detecção de cepas resistentes  
     a fármacos, 251  
   - para identificação das micobactérias, 251  
 Testes para detecção de exoantígeno  
   - fungos filamentosos, 378  
 Testes sorológicos  
   - na patologia clínica, 4  
   - doença de Chagas, 272  
   - toxoplasmose, 306  
 Testes treponêmicos, 236  
 Tiabendazol, 354  
 Timina, 55  
 Tinha negra, 395

Titulação simples, 30  
 Tomografia computadorizada  
   - hidatidose, 340  
 Toxina da síndrome do choque tóxico, 175  
*Toxocara*, 352  
 Toxocaríase  
   - alterações laboratoriais, 354  
   - diagnóstico, 355  
   - epidemiologia, 352  
   - gênero *Toxocara*, 352  
   - manifestações clínicas, 353  
   - ocular, 354  
   - perspectivas, 360  
   - tratamento, 354  
   - visceral, 353  
*Toxoplasma gondii*, 305  
   - isolamento do, 305  
 Toxoplasmose, 4  
   - aspectos clínicos, 305  
   - aspectos epidemiológicos, 305  
   - aspectos parasitológicos, 305  
   - detecção de ácidos nucleicos, 306  
   - diagnóstico laboratorial, 305  
   - em gestantes, 309  
   - isolamento do toxoplasma, 305  
   - no feto, 310  
   - no imunodeficiente, 310  
   - no recém-nascido, 311  
   - nos pacientes imunodeficientes, 311  
   - ocular, 312  
   - perfis e marcadores sorológicos, 308  
   - pesquisa de antígenos, 306  
   - pesquisa de imunidade mediada por células, 308  
   - reação em cadeia da polimerase, 306  
   - testes sorológicos, 306  
 Tracoma, 195  
 Transplantes  
   - seleção de doadores e receptores de  
     órgãos para, 4  
*Treponema pallidum*, 235  
*Triatoma brasiliensis*, 269  
*Triatoma dimidiata*, 269  
*Triatoma infestans*, 269  
*Trichophyton*, 403  
*Trichosporon*, 366, 385, 413  
 Tricomose nodular, 397  
 Tricosporonose, 413  
 Tricrômio, 261  
 Triptase, 454  
*Trypanosoma cruzi*, 269  
 Tuberculose, 243  
   - aspectos clínicos, 243  
   - aspectos epidemiológicos, 243  
   - detecção de resposta celular, 247  
   - diagnóstico clínico e laboratorial, 244  
   - diagnóstico etiológico, 244  
   - disseminada, 244  
   - extrapulmonar, 244  
   - métodos de imagem, 244

  - métodos imunológicos, 246  
   - micobacterioses, 248  
   - pulmonar, 243  
   - testes moleculares, 250  
 Turbidimetria, 42

## U

*Ureaplasma* spp., 212  
 Urease, 382  
 Urticária crônica, 353

## V

Vacinação antirrubéola, 144  
   - em grávidas, 145  
 Vacinas  
   - *Streptococcus agalactiae*, 190  
   - *Streptococcus pyogenes*, 190  
   - *Streptococcus pneumoniae*, 190  
 Validação de um teste diagnóstico, 6  
 Valor preditivo  
   - de um resultado negativo, 8  
   - de um resultado positivo, 8  
 Vasculites sistêmicas, 467  
 Verdadeiro-negativo (VN), 7  
 Verdadeiro-positivo (VP), 7  
 Vesículas hidáticas, 338  
 Vírus da hepatite E, 89  
   - características, 89  
   - constituição genômica, 89  
   - transmissão, 90  
   - evolução clínica, 90  
   - prevalência, 91  
   - replicação viral, 91  
   - diagnóstico laboratorial, 91  
   - prevenção, 91  
   - tratamento, 91  
 Vírus Epstein-Barr, 136  
 Vírus linfotrópico de células T humanas  
   do tipo I, 121  
 Vitek®, 383

## W

*Western blotting*, 33, 210  
   - quimioluminescente, 37  
*Wild type*, 393

## X

Xenodiagnóstico, 271  
   - doença de Chagas, 271

## Z

Zidovudina, 105  
 Zigomicose, 429  
*Zwiterions*, 15